



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

BIOSINTESIS DE ENCEFALINAS EN EL CEREBRO
DEL AJOLOTE (Ambystoma mexicanum)

T E S I S
Que para obtener el título de:
B I O L O G O
P r e s e n t a:
AGUSTINA CANO MARTINEZ

MEXICO, D.F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

BIOSINTESIS DE ENCEFALINAS EN EL CEREBRO
DEL AJOLOTE (Ambystoma mexicanum)

	Pág.
1.0 INTRODUCCION	1 - 3
1.1 Las encefalinas	3 - 5
1.2 Las encefalinas como neurotransmisores putativos en el SNC y su posible papel fisiológico..	5 - 9
2.0 BIOSINTESIS	
2.1 Proteínas de exportación	
2.1.a Aspectos generales	9 - 10
2.1.b Descripción de los principales eventos que participan en la biosíntesis de las proteínas de exportación	10 - 15
2.2 Péptidos opioides	
2.2.a Aspectos generales	15
2.2.b Evidencias sobre los pasos involucrados en la biosíntesis de los péptidos opioides	15 - 27
3.0 PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA..	27 - 32
4.0 BIOLOGIA DEL AJOLOTE (<u>Ambystoma mexicanum</u>)	
4.1 Características generales del ajolote	32 - 35
4.2 El Sistema Nervioso Central (SNC) del ajolote	35 - 38
5.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38 - 41
6.0 MATERIAL Y METODOS	41 - 49

Pág.

7.0	RESULTADOS	49 - 52
8.0	DISCUSION Y CONCLUSIONES	52 - 61
9.0	BIBLIOGRAFIA	62 - 80
10.0	APENDICE	81

En los organismos multicelulares la comunicación celular es necesaria para regular su desarrollo, organización en tejidos, crecimiento, reproducción, coordinación de sus actividades y comportamiento. Las células pueden comunicarse de forma directa (contacto físico directo) o indirecta (por medio de sustancias químicas secretadas). Esta última se conoce como comunicación química y opera de tres formas diferentes:

1) Por mediadores químicos locales. Muchas de las células en el cuerpo secretan una o más sustancias que actúan sobre las células de su medio ambiente inmediato ejemplo, todos los tejidos inervados por nervios simpáticos que secretan el factor de crecimiento nervioso: como las células mast que secretan histamina.

2) Por medio de hormonas, secretadas por las células endócrinas (insulina, ACTH, FSH, LH, etc.) y viajan a través del torrente sanguíneo para influenciar a las células blanco; distribuidas en el cuerpo.

3) A través de neurotransmisores. Las células nerviosas secretan estos mediadores químicos que actúan solamente en la célula blanco adyacente. El transmisor se difunde hacia la célula blanco, recorriendo una distancia microscópica: el proceso se efectúa en menos de un milisegundo. Ejemplos: glicina, GABA, acetilcolina, norepinefrina y encefalinas.

Las sustancias químicas que participan en la comu-

nicación celular son diferentes en cuanto estructura y función, e incluyen:

- Proteínas y glicoproteínas (insulina, TSH, ACTH, FSH, etc.).
- Derivados de ácidos grasos (prostaglandina E2).
- Esteroides (testosterona, cortisol, estradiol).
- Péptidos (vasopresina, somatostatina, factor liberador de TSH y encefalinas).
- Aminoácidos y compuestos relacionados (glicina, histamina, norepinefrina, epinefrina, tiroxina, GABA, acetilcolina).

Los mecanismos de comunicación química por hormonas y neurotransmisores son muy semejantes. Muchas de las sustancias usadas por células endócrinas, también son utilizadas por células nerviosas (1').

En diferentes tejidos de varios vertebrados e invertebrados se han identificado diversos péptidos biológicamente activos, que pueden funcionar como hormonas, neurohormonas o neurotransmisores, dependiendo del tejido donde se localizan (74).

En el caso particular del tejido nervioso y especialmente en el cerebro de los vertebrados, se ha comprobado la existencia de numerosos neuropéptidos, entre los cuales se encuentran las encefalinas; mismos que se han propuesto como posibles neurotransmisores o neuromoduladores (45, 159). Algunas de estas sustancias fueron inicialmente identificadas como hormonas de la glándula hipófisis o del tracto gastrointestinal, por ejemplo, la hormona adrenocor-

ticotrópica o ACTH y la Gastrina respectivamente. Otras secretadas por el hipotálamo para controlar la liberación de las hormonas hipofisiarias, como es el caso de la Somatostatina y el factor liberador de la hormona luteinizante; e inclusive como hormonas locales, por ejemplo, la Colecistoquinina (140).

1.1 Encefalinas

Las encefalinas fueron los primeros péptidos opioides* endógenos identificados en el cerebro de los vertebrados; su descubrimiento fue el resultado de la búsqueda de sustancias endógenas que se unieron a los receptores de la morfina (49, 51).

A partir de su descubrimiento, hacia principios del siglo XIX (28), la morfina se ha utilizado en medicina durante mucho tiempo, por sus efectos analgésicos aunque poco se conocía sobre su mecanismo de acción. Es hasta la década de los años setenta, al ser identificados los receptores que se unen a la morfina y a otras sustancias alcaloides opiáceas* (38, 113, 135) cuando se aportan evidencias más claras.

Al observar que solamente la forma levorrotatoria de una mezcla racémica de alcaloides opiáceos producían los efectos analgésicos (38); se pensó que podrían existir sitios de unión estereoespecíficos para los opiáceos.

* Consultar el apéndice.

Dos años después, diferentes grupos de investigación (113, 135), detectaron sitios de unión estereoespecíficos para la morfina y otros opiáceos en membranas de células nerviosas. A partir de entonces la existencia de los receptores opiáceos ha sido confirmada (95, 99, 110, 111).

La acción farmacológica de la morfina se evalúa mediante el bioensayo del conducto deferente de ratón (42) y el ileo de cobayo (71), donde en presencia de opiáceos se inhiben las contracciones evocadas eléctricamente siendo sus efectos revertidos por naloxona. Tomando en cuenta que: a) la estimulación eléctrica de la materia gris del cerebro de rata producía analgesia (96); b) que el efecto era revertido por antagonistas* de la morfina (1); c) que en las células nerviosas habían sido detectados sitios de unión para los opiáceos y dicha unión era de carácter estereoespecífico (38, 113, 135), se propuso que los receptores opiáceos podrían tener un significado biológico relacionado con la presencia de ligandos agonistas* endógenos.

En ese momento varios grupos de investigación dirigieron sus trabajos hacia la búsqueda de ligandos endógenos de los receptores de la morfina. En 1975, J. Hughes (49), encontró que en homogenados de cerebro de cerdo, existían compuestos de naturaleza peptídica, semejantes a la morfina en cuanto a su acción farmacológica denominándolos

* Consultar el apéndice.

ENCEFALINAS dada su ubicación en el encéfalo. Ese mismo año, este grupo de investigación, identificó, caracterizó y sintetizó químicamente a los péptidos responsables, evaluando sus características farmacológicas con bioensayos convencionales utilizados para opiáceos (51).

Sus resultados indicaron que se trataba de dos péptidos de cinco aminoácidos cada uno, con la siguiente composición y secuencias:

Composición

<u>Aminoácido</u>	<u>Símbolo</u>
Tirosina	Tir
Glicina	Gli
Fenilalanina	Fen
Metiotina	Met
Leucina	Leu

Secuencia

NH ₂ -Tir ¹ -Gli ² -Gli ³ -Fen ⁴ -Met ⁵ -COOH	Metionina-Encefalina
NH ₂ -Tir- Gli -Gli -Fen -Leu -COOH	Leucina-Encefalina

Durante los siguientes diez años posteriores al descubrimiento de las encefalinas, han sido identificados otros péptidos opioides endógenos en el tejido nervioso y adrenal de los mamíferos. Estos contienen en su secuencia una copia o más de alguna de las encefalinas; ya sea Metionina-Encefalina (ME) o Leucina-Encefalina (LE) (tabla 1).

1.2 Las encefalinas como neurotransmisores putativos en el SNC y su posible papel fisiológico

Desde su descubrimiento se planteó que las encefalinas podrían actuar como neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados (51).

Tabla 1. PEPTIDOS OPIOIDES

PEPTIDO	ME	LE	TEJIDO	No.aa.	P	Ref.
B-end	1		H de R y de Cam	31	POMC	84, 92, 120
HE	1		MAB y EB	77	PEF	143, 144
OC	1		MAB	8	PEF	67
HEX	1		MAB	6	PEF	144
Pep. F	2		MAB	34	PEF	149
Pep. I	1	1	MAB	39	PEF	149
Pep. E	1	1	MAB	35	PEF	149
BAM 12P	1		MAB	12	PEF	102
BAM 20P	1		MAB	20	PEF	102
BAM 22P	1		MAB	22	PEF	102
Pep. 8.6KD	1		MAB	77	PEF	57
Pep. 12.6KD	3		MAB	113	PEF	7
Pep. 18.6KD	4		MAB	165	PEF	66
MT	1		CB	8	PEF	156
AM	1		MAB	26	PEF	131
a-Neoen		1	Hp pc	10	PDFN	60
b-Neoen		1	Hp pc	9	PDFN	100
Din 1-17		1	H y D de pc	17	PDFN	37 145
Din 1-8		1	H de R y Hp de pc	8	PDFN	101
Din-B o						
Rim		1	Hp de pc	13	PDFN	30 68
Din 1-24		1	H de pc	24	PDFN	64
Din 1-29		1	H de pc	29	PDFN	10

En esta tabla se incluye la mayoría de los péptidos opioides conocidos. Estos contienen una copia o más de alguna de las encefalinas (Metionina-Encefalina o Leucina-Encefalina). Se anota el precursor del cual provienen y el número de encefalinas que presentan. Se considera el tejido donde originalmente fueron identificados.

Abreviaciones: ME=Metionin-Encefalina; LE=Leucina-Encefalina; No.aa.=número de aminoácidos; P=precursor; Ref=referencia; B-end = beta endorfina; H=hipófisis; R=roedor; Cam=camello; POMC=proopioimelanocortina; HE=heptapéptido (ME-Arg⁶-Phe¹); MAB=médula adrenal de bovino; EB=estriado de bovino; PEF=proencefalina; OC=octapéptido (ME-Arg⁶-Gli⁷-Leu⁸); HEX=hexapéptido (ME-Arg⁶); Pep. F=péptido F; Pep. I=péptido I; Pep. E=péptido E; MT=metorfamida; AM=amidorfán; CB=cerebro de bovino; a-Neoen=alfaneoendorfina; B-Neoen=beta neoendorfina; Hp=hipotálamo; pc=porcino; PDFN=prodinorfina; Din 1-17=dinorfina (1-17); Din 1-8=dinorfina (1-8); Din-B=dinorfina B; Rim=rimorfina; Din 1-24=dinorfina (1-24); Din 1-29=dinorfina (1-29) o leumorfina; KD=kilodaltons.

Los criterios generales para considerar a una sustancia como neurotransmisor se enumeran a continuación (59).

La sustancia debe:

- 1) Sintetizarse en las neuronas.
- 2) Estar presente en terminales sinápticas.
- 3) Ser liberada bajo el efecto de estímulos depolarizantes y requiriendo de calcio.
- 4) Liberarse en cantidades suficientes para ejercer su acción en la neurona u órgano efector.
- 5) Provocar una respuesta semejante al transmisor liberado endógenamente, al ser aplicado de manera exógena.
- 6) Tener un mecanismo que lo remueva de su sitio de acción (en el espacio sináptico).

Comparando estas características con las descritas para las encefalinas, se obtienen similitudes importantes:

- 1) Se sintetizan en las neuronas (48, 88, 97, 106).
- 2) Se han encontrado en terminales sinápticas, dentro de vesículas o gránulos de secreción (99, 160).
- 3) Se liberan por depolarización eléctrica y con altas concentraciones de potasio (43, 86, 108). Su liberación es calcio-dependiente y asociada a gránulos de secreción (45, 53, 108).
- 4) Al ser aplicadas exógenamente, producen efectos similares a los provocados por las encefalinas endógenas (99, 127).

- 5) Una vez que ejercen su acción, se ha observado su inactivación por peptidasas que las hidrolizan (19, 129). También se ha propuesto un mecanismo de recaptura (123, 147).

Estas evidencias apoyan la hipótesis de que estos neuropéptidos pueden participar en procesos neuronales, actuando como sustancias neurotransmisoras.

Debido a que tanto las encefalinas, como los receptores opiáceos se encuentran en regiones cerebrales, que se sabe intervienen en la función del dolor, y en base a los efectos analgésicos de las encefalinas, se ha propuesto su participación en la regulación del dolor. Dicho aspecto ha recibido la mayor atención respecto al posible papel fisiológico de las encefalinas (54, 70, 75, 96, 103).

Por la presencia de las encefalinas en diferentes órganos, se ha sugerido su participación en otras funciones relacionadas con la estructura u órgano donde se han localizado (127, 157, 117).

También se ha propuesto su intervención en algunas patologías que involucran desórdenes cerebrales, como la esquizofrenia y la epilepsia (7, 32, 152).

El estudio de las encefalinas ha resultado de gran interés desde diferentes puntos de vista. De manera global se han enfocado hacia la identificación de su significado fisiológico en el SNC y otros tejidos. Y sobre las características propias de estos neuropéptidos (sus características bioquímicas y neuroquímicas). Aunque en la actualidad existe

gran cantidad de información en relación a tales aspectos, aun hace falta ordenar, aclarar y precisar los diferentes hallazgos de una forma definitiva.

En el caso de la biosíntesis de las encefalinas, la mayoría de los datos se han obtenido a partir del tejido adrenal de mamífero. Inicialmente se pensó que los resultados obtenidos de este tejido, podían ser extrapolados al tejido cerebral, sin embargo los estudios en el cerebro indican que tal extrapolación no se cumple en todos los casos y al parecer existen diferencias de tejido específicas. Por esto resulta necesario efectuar estudios directamente con el tejido cerebral para poder esclarecer los mecanismos involucrados en la biosíntesis de las encefalinas, proceso que influye en su disponibilidad y por tanto en su posibilidad de acción.

Si se considera que el SNC de los mamíferos es sumamente complejo, a tal grado que muchos aspectos fundamentales de sus características son difícilmente identificables, aunado a la gran complejidad que se observa en el sistema de péptidos opioides endógenos, al cual pertenecen las encefalinas (ver sección 2.2) y asumiendo que el SNC de los vertebrados "inferiores" como los anfibios presenta las mismas características básicas que se presentan en los mamíferos, pero sin las innumerables complicaciones de redes neuronales y de maquinaria neuroquímica que se observa en estos últimos. En el presente trabajo se revisan algunos aspectos sobre la biosíntesis de las encefalinas, utilizando el encéfalo y la

glándula hipófisis de un anfibio perteneciente al Orden de los Urodelos, el Ambystoma mexicanum, conocido comúnmente como AJOLOTE.

2.0 BIOSINTESIS

2.1 Proteínas de exportación

2.1.a Aspectos generales

Se ha propuesto que en las células eucariotes las proteínas que se sintetizan en los ribosomas libres son destinadas al uso intracelular, en tanto que las que se sintetizan en los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico (RE) son de uso extracelular.

En el caso de las proteínas de exportación (de uso extracelular) se ha propuesto un modelo que explica su biosíntesis y su liberación mediante una serie de eventos en los que participan además de la transcripción y la traducción, procesos postraduccionales, tales como modificaciones enzimáticas y rompimiento proteolítico de las proteínas precursoras durante el transporte intracelular a través del retículo endoplásmico rugoso (RER) y el complejo de Golgi, mediado por gránulos de secreción; proceso que termina con la liberación de los productos finales por exocitosis (109, 141, 142).

La síntesis y transporte de las proteínas de exportación es bien conocido gracias a los estudios en las células exócrinas donde se sintetizan los zimógenos (tripsinóge-

no y quimiotripsinógeno) (109). También por los estudios sobre la biosíntesis de la insulina donde se propone que esta proteína se forma a partir de una molécula precursora de alto peso molecular, que se procesa durante su transporte intracelular para dar lugar a la molécula activa de insulina (141, 142). Así mismo por los estudios efectuados en algunos sistemas neurosecretorios, donde hay evidencias de un transporte intracelular que incluye un transporte axónico mediado por gránulos de secreción que liberan a los neuropeptidos cuando las terminales nerviosas son depolarizadas (10). Ver esquema 1, 2 y 3.

2.1.b Descripción de los principales eventos que participan en la biosíntesis de las proteínas de exportación

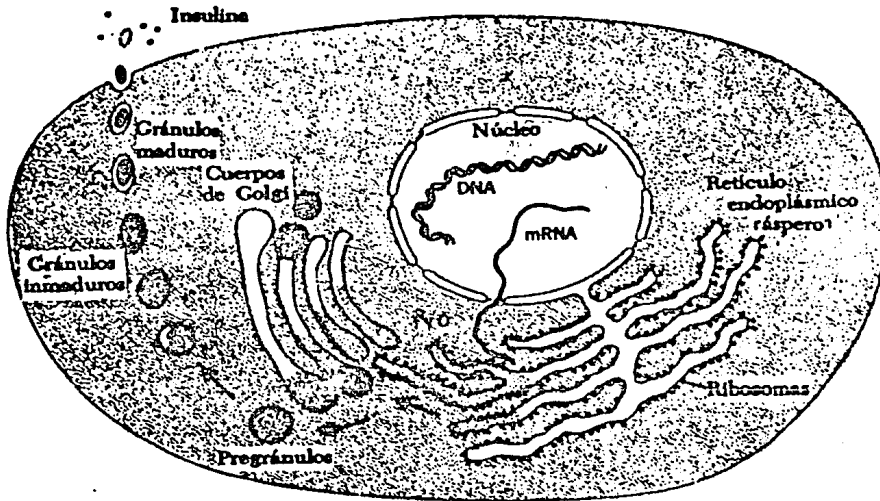
Transcripción

La información genética para una determinada proteína de exportación contenida en el DNA del núcleo celular se transcribe en RNA heterogéneo específico, que mediante modificaciones postranscripcionales (3' poliadenilación, remoción de intrones y arreglo apropiado de exones) da lugar al RNA mensajero (RNAm) maduro; mismo que pasa hacia el citoplasma y se une a los ribosomas del RER (21, 79).

Traducción

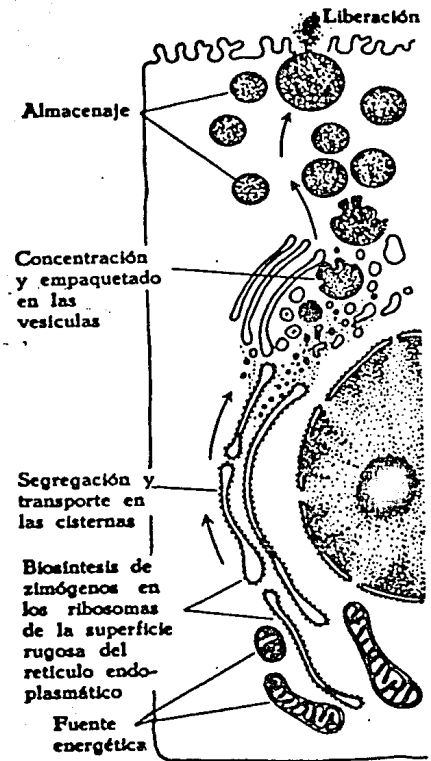
Durante esta fase, el RNAm unido a los ribosomas del RER, dirige el orden de unión de los aminoácidos especí-

Esquema 1

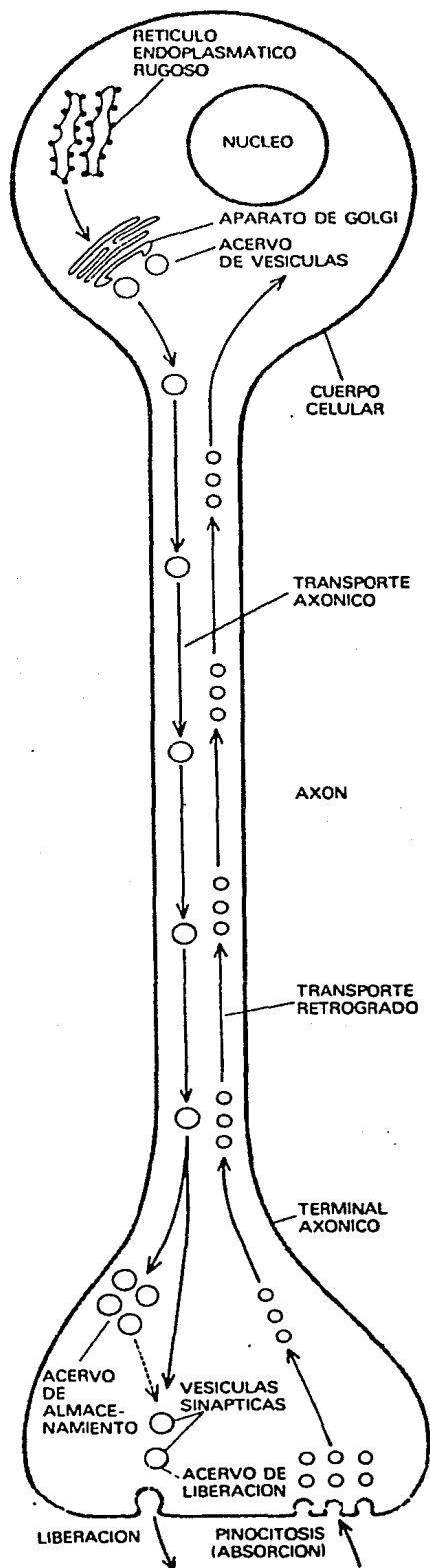


Esquema 1: Representación esquemática de una célula pancreática. Se muestran las etapas de secreción de proteínas zimógenas.

Esquema 2



Esquema 2: Representación esquemática de la biosíntesis de la insulina en una célula Beta de los islotes de Langerhans en el tejido pancreático.



Esquema 3: Representación esquemática de la biosíntesis de los neuropéptidos. La traducción del RNAm ocurre en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER) a nivel del cuerpo neuronal (celular). Los productos de síntesis (molécula proteica precursora o propéptido) son llevados hacia el espacio cisternal del RER. El empaquetamiento de los productos dentro de los gránulos de secreción se efectúa en el aparato de Golgi. En los gránulos de secreción ocurre el procesamiento postraduccional que dará lugar a productos peptídicos más pequeños, lo cual puede ocurrir en el cuerpo celular o bien durante el transporte axónico. Los productos peptídicos se almacenan en los gránulos de secreción en las terminales nerviosas, hasta que se presentan los estímulos adecuados para su liberación.

Tomado de Brownstein et al., 1980.

ficos que constituirán una determinada proteína de exportación (21, 79).

Estudios bioquímicos han revelado que al igual que la insulina muchos otros productos proteicos y peptídicos (141, 142) y todos los neuropéptidos examinados (45, 159), se sintetizan ribosomalmente como parte de una proteína precursora de alto peso molecular que es inactiva.

Se sugiere el nombre de preproteína para el producto directo de la traducción del RNAm. El prefijo pre se refiere a la secuencia de aminoácidos con características hidrofóbicas en el extremo amino terminal de la proteína recién formada y se conoce con el nombre de "péptido señal" (PS) (72, 142).

Al parecer durante la traducción ocurren algunos eventos del procesamiento, como la inserción de la región del PS a la membrana del RER, lo cual, según el modelo interviene en el paso de la proteína recién sintetizada hacia el espacio cisternal (142). La remoción eventual del PS por una peptidasa que podría estar asociada a las membranas del RER (55, 73). Modificaciones co-traduccionales como la fosforilación, gliocosilación, formación de puentes disulfuro e hidroxilación de residuos de prolina y lisina por enzimas de la membrana del RER o del espacio cisternal (109).

Postraducción y transporte (Procesamiento postraducciona)

Al término de la traducción, las proteínas recién formadas, pasan a través del RER y el complejo de Golgi

hacia los gránulos de secreción, donde los productos se almacenan y transportan. Durante el transporte ocurren las modificaciones enzimáticas y el rompimiento proteolítico que originan a los productos bioactivos (141).

El modelo propone que el movimiento de los productos de síntesis proteica del RER hacia el complejo de Golgi es mediado por pequeñas vesículas de transporte que parecen estar unidas a las regiones lisas del RE y que se funden con los elementos "cis" del complejo de Golgi (109).

El rompimiento proteolítico que se inicia en el Golgi, continúa conforme se da la maduración y concentración de los productos en los gránulos de secreción nuevamente formados a partir de los elementos "trans" del complejo de Golgi (62, 91).

Se reconoce que las modificaciones enzimáticas de acetilación, glicosilación, sulfatación y amidación ocurren en el complejo de Golgi (109, 141, 142). Se considera que éstas no tienen ninguna influencia sobre los patrones proteolíticos, sin embargo, dichos patrones sí podrían estar influenciados por la estructura primaria, secundaria y terciaria de la molécula precursora (141).

En el caso de las prohormonas y otras proteínas precursoras (progastrina, prosomatostatina, proglucagón, provasopresina, prooxitosina, proalbúmina, proinsulina, etc.) los sitios de rompimiento más frecuentes son pares de aminoácidos básicos (Arg-Arg, Arg-Lis, Lis-Lis). Estos limitan hacia ambos lados a los péptidos biológicamente activos en

la secuencia de la molécula precursora, sugiriendo la participación de enzimas del tipo de la tripsina.

Se ha observado que en algunos precursores, los rompimientos proteolíticos no siempre se dan a nivel de pares de aminoácidos básicos, ni todos los sitios donde existen pares de aminoácidos básicos se rompen; esto último se explica suponiendo que los aminoácidos correspondientes a sitios potenciales de rompimiento, podrían estar ubicados en segmentos del precursor que fueran inaccesibles a las proteasas. Por ejemplo, regiones helicoidales. Esta suposición sólo podrá ser confirmada cuando se conozca la estructura tridimensional de la molécula precursora (141, 142).

Respecto al transporte en sistemas neurosecretorios, el esquema más claro, se encuentra en el sistema hipotálamo-hipófisiario. En éste las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico (NSO) y el núcleo paraventricular (NPV) que sintetizan vasopresina (VP) y oxitocina (OX), extienden sus axones hacia la hipófisis posterior (neurohipófisis), pasando por la eminencia media. Las características anatómicas de este sistema ha permitido su utilización experimental para obtener información de los diferentes estados de maduración de la VP (34).

En el caso de las células neurosecretoras se propone un esquema de eventos a nivel celular, semejante. Durante el transporte celular y axónico, con un periodo de tiempo suficiente que permite la maduración proteolítica de los precursores (10, 34).

Experimentos de "pulso-caza" (donde se determina la incorporación de aminoácidos marcados radioactivamente a la síntesis de proteínas) han demostrado que los precursores de la VP y la OX con su correspondientes neurofisininas cambian en su punto isoeléctrico y peso molecular. Esto sugiere la participación de eventos proteolíticos y modificaciones enzimáticas durante el transporte en el cuerpo celular y durante el transporte axónico. En ambos casos se han encontrado intermediarios marcados. En estos experimentos se encontró que los productos marcados en el NSO pasan hacia la neurohipófisis mediante un componente de transporte axónico rápido y sensible a colchicina (10).

Secreción

Los productos finales de todo este proceso se almacenan temporalmente en los gránulos de secreción, hasta que se presenta el estímulo adecuado para su liberación. La compartimentalización en los gránulos parecen ser una característica común a todas las proteínas de exportación, permitiendo que las sustancias puedan ser almacenadas y transportadas desde el sitio de síntesis hasta el de su secreción.

Se propone que la secreción se efectúa mediante exocitosis, por la fusión dependiente de calcio de las membranas de gránulo secretorio con la membrana plasmática. La liberación del contenido al exterior de la célula tiene efecto una vez que se abre el lumen del gránulo, después de la fusión de las membranas (109).

En el caso de los neuropéptidos, el contenido de los gránulos se libera cuando las terminales nerviosas son depolarizadas, la liberación involucra fusión dependiente de calcio entre las membranas de los gránulos y las membranas de las terminales nerviosas, seguida de la apertura y secreción de los productos (10).

2.2 Péptidos opioides

2.2.a Aspectos generales

Se ha planteado que los péptidos opioides forman parte de sistemas neurosecretorios y se asume de manera general que los procesos biosintéticos que los generan son básicamente los mismos que se han propuesto para las proteínas de exportación (159).

2.2.b Evidencias sobre los pasos involucrados en la biosíntesis de los péptidos opioides

Transcripción

Con el uso de la técnica del RNA recombinante y la química de proteínas se ha sugerido que los péptidos opioides se derivan del procesamiento de tres proteínas precursoras inactivas que se sintetizan ribosomalmente. Estas son: Proopiomelanocrotina (POMC) (104), Proencefalina (PEF) (13, 40, 107) y Prodinorfina (PDNF) (58).

Estas 3 proteínas con sus péptidos derivados correspondientes (figura 1) representan a los tres sistemas de péptidos opioides endógenos conocidos, mismos que en el SNC

se diferencian por su distribución regional (figura 2 y cuadro 1) (8, 63, 153, 154).

Los hallazgos de otros péptidos opioides endógenos, posteriores a las encefalinas han revelado que presentan en su secuencia una o más copias de alguna de las encefalinas (tabla 1 y figura 1).

La POMC genera varios péptidos bioactivos, de los cuales sólo la Beta-endorfina y sus derivados de menor peso molecular son de naturaleza opioide. La PEF también da lugar a varios productos bioactivos que a diferencia de los de la POMC y al igual que los de la PDNF, todos son de naturaleza opioide (tabla 1).

La molécula de la PEF contiene en su secuencia a las dos encefalinas (6ME y 1LE), mientras que la PDNF contiene tres secuencias de LE. Por su parte la POMC sólo contiene una secuencia de ME.

La posibilidad de que la POMC pueda ser el precursor de las encefalinas, ha sido descartada, dada la ausencia de la secuencia de LE. Aunque la ME forma parte de la molécula de la POMC no es un producto final de ésta, sino que, forma la parte amino terminal de la B-end. Además de las evidencias aportadas por los estudios de distribución de los péptidos opioides (8, 63, 99, 153).

Aunque la PDNF contiene tres secuencias de LE, la mayoría de las evidencias apoyan la idea de que las encefalinas se derivan de la PEF; sin embargo, la posibilidad de que la PDNF pueda dar lugar a la LE en algunos tejidos no

Figura 2. Representación esquemática de la distribución de los péptidos derivados de la proopiomelanocortina, proencefalina y prodinorfina en el SNC de rata y ratón, en mapas parasagitales.

Proopiomelanocortina. Contiene una copia de Beta endorfina (opioide), una de ACTH, tres copias de MSH (alfa, beta, gama). En el cerebro la mayor población neuronal con POMC se localiza en núcleos arcuato, con proyecciones a muchos núcleos límbicos y del tallo cerebral.

Proencefalina (PEF). Este sistema codifica para varios péptidos que contienen como centro opioide activo la secuencia Tir-Gli-Gli-Fen-Met (Leu). Esta incluye una copia de Leucina-Encefalina (LE), cuatro copias de Metionina-Encefalina (ME) y una copia de ME-Arg-Fen (Heptapéptido (HE) y ME-Arg-Gli-Leu (octapéptido (OC)).

Prodinorfina (PDNF). Codifica para varios péptidos opioides activos que contienen la secuencia de la LE. Estos incluyen la dinorfina A dinorfina B y la alfa-neoendorfina.

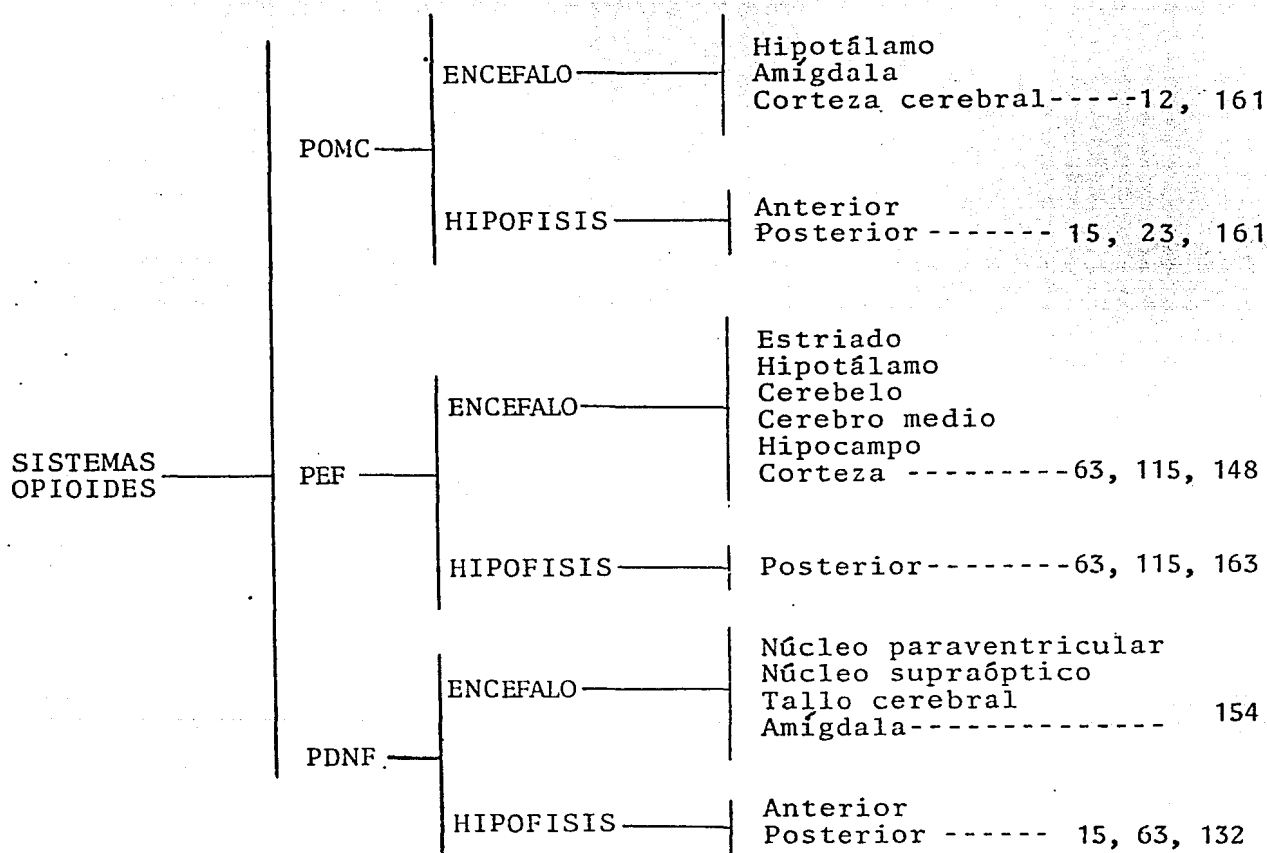
En los mapas, el pericarion neural es mostrado como círculos sólidos y las fibras terminales como líneas curvas cortas y puntos. Cada mapa representa múltiples niveles parasagitales a través del cerebro de rata.

Abreviaciones: AA=amígdala anterior; ABL=núcleo basolateral de amígdala; AC=comisura anterior; ACB=núcleo acumbens; ACE=núcleo central de la amígdala; AD=núcleo anterodorsal del tálamo; AL=lóbulo anterior de la hipófisis; AM=núcleo anteromedial del tálamo; AMB=núcleo ambiguo; AME=

núcleo medial de la amígdala; AON=núcleo olfatorio; ARC=núcleo arcuato; AV=núcleo anterolateral del tálamo; BST=núcleo de la estria terminalis; CC=cuerpo calloso; CGX=corteza angular; CM=núcleo medio-central del tálamo; COCH=complejo nuclear cloclear; CPU=caudado-putamen; CST=tracto corticospinal; DH=hueso de la espina dorsal; DG=girus dentado; DM=núcleo dorsomedial del hipotálamo; DNV=núcleo dorsomotor del vago; DTN=núcleo dorsal tegmental; FM=núcleo fatigal del cerebelum; FRX=corteza frontal; GL=capa glomerular del bulbo olfatorio; GP=globus palidum; HM=núcleo medial habenular; HPC=hipocampo; IC=colliculus inferior; IL=lóbulo intermedio de la hipófisis; LC=núcleo locus coeruleus; LG=núcleo geniculado lateral; LHA=área lateral hipotalámica; LRN=núcleo lateral reticular; MG=núcleo medial geniculado; ML=lemnisco medial; MM=núcleo medial mamilar; MNT=núcleo mesencefálico trigeminal; MVN=núcleo medial vestibular; NCU=núcleo cuneatus; NCX=neocorteza; NL=lóbulo neural de la hipófisis; NRG=núcleo reticularis giganteocelularis; NTS=núcleo del tracto solitario; OCX=corteza occipital; OR=tracto óptico; OTU=tubérculo olfatorio; PAG=gris periacueductal; PAX=corteza periamigdalóide; PBN=núcleo parabrancial; PC=comisura posterior; ON=puente; POA=área preóptica; PV=núcleo paraventricular del tálamo; RE=núcleo raphe dorsalis, RF=formación reticular; R=raphe; SNC=sustancia negra compactada; SNR=sustancia negra reticulada; SNT=núcleo sensorio trigeminal; SON=núcleo supraóptico; SPT=núcleo septal; STN=núcleo espinal del trigeminal; SUB=subiculum; VM=núcleo ventromedial del hipotálamo; VP=paludum ventral; ZI=zona incerta. Tomado de Khachaturian et al., 1985.

Cuadro 1. . DISTRIBUCION DE PEPTIDOS OPIOIDES

Ref.



Las referencias en esta tabla corresponden a estudios sobre la medición del RNAm que codifica para cada precursor y estudios sobre la distribución de inmunorreactividad para péptidos derivados de los tres precursores opioides respectivamente.

puede ser descartada. Inclusive se ha propuesto una vía dinorfinérgica para la LE en la sustancia negra del cerebro de rata, por lo que en este tejido y probablemente en otros, la LE podría generarse a partir de los precursores que la contienen (13, 157, 162).

Estructuralmente como se observa en las figuras 1 y 3, las tres moléculas precursoras de péptidos opioides tienen varias características en común:

- Peso molecular muy parecido, cercano a 30 000 Da.
- Número de aminoácidos muy similar, variando entre 209 y 267. Son consideradas diferentes especies.
- En la mayoría de los casos las secuencias correspondientes a péptidos biológicamente activos dentro de la secuencia del precursor están limitadas hacia ambos lados por pares de aminoácidos básicos.
- La región amino terminal es rica en residuos de cisteína y no incluye aminoácidos de reconocimiento proteolítico típico y está precedida por una secuencia aminoácida "señal", de naturaleza hidrofóbica.

Colectivamente en estas proteínas se observan las similitudes bioquímicas de los tres precursores opioides. Existe la posibilidad de que hayan evolucionado de formas moleculares relacionadas (21, 23, 45). La presencia de regiones nucleótidas repetitivas en los genes de POMC y PEF ha llevado a plantear que estos genes han evolucionado por una vía de duplicaciones y eventos de rearrreglo a partir de secuencias ancestrales, semejantes a la MSH y las encefalinas respectivamente (45).

PRECURSOR

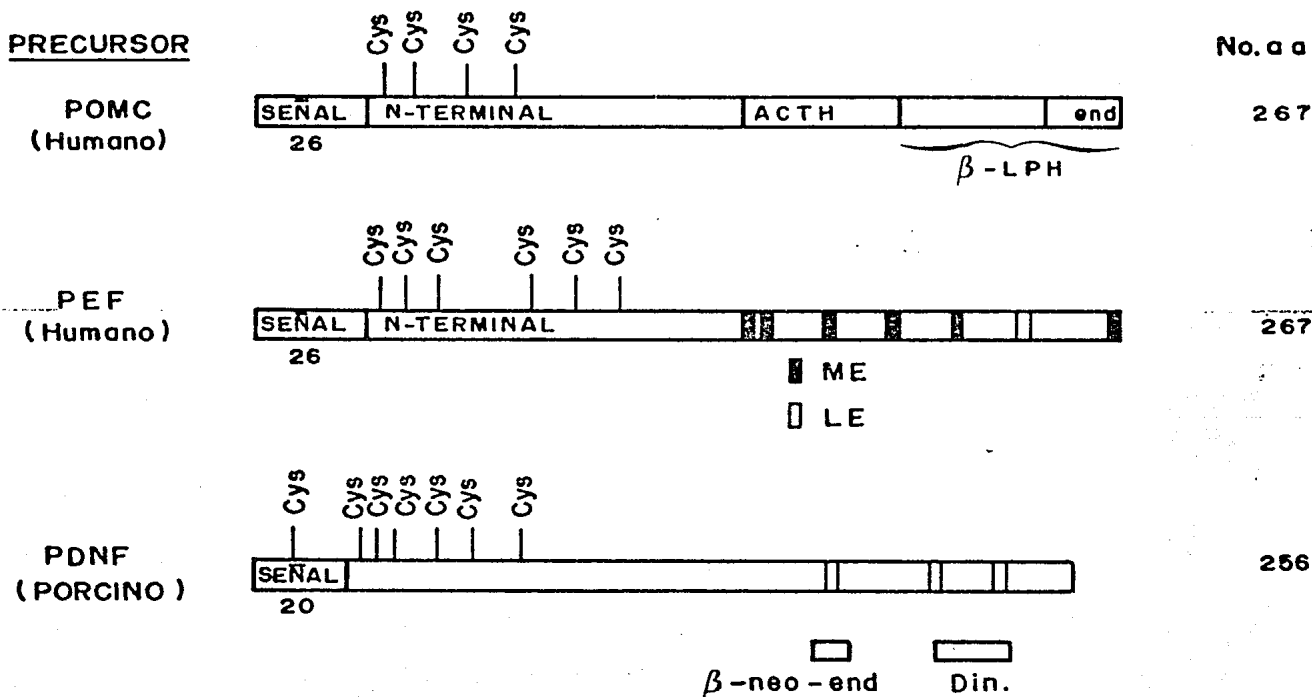


Figura 3: Semejanzas estructurales entre los precursores de los péptidos opioides. Abreviaciones: POMC=proopiomelancortina, N-terminal=amino terminal, ACTH=hormona adrenocorticotrópica, end=endorfina, B LPH=beta lipotropina, PEF=proencefalina, ME=Metionina Encefalina, LE=Leucina Encefalina, PDNF=prodinorfina, B-neo-end= beta neoendorfina, Din=dinorfina. No. aa=número de aminoácidos.

Tomado de Douglas et al. 1984

Con el avance en las técnicas de biología molecular ha sido posible determinar la distribución de RNAm transcrito para los genes de la POMC y la PEF en la hipófisis y cerebro de rata. Se encontró que el gene de la POMC es transcrito en el hipotálamo, amígdala y corteza cerebral (12) y en los lóbulos anterior (LA) y lóbulo neurointermedio (LNI) de la hipófisis (23). El gene de la PEF es transcrito en orden de abundancia en el estriado, hipotálamo, cerebelo, cerebro medio, hipocampo y corteza (148). En ambos casos se ha sugerido un mecanismo de regulación a nivel transcripcional.

La remoción de la corteza adrenal (fuente de gluco-corticoides endógenos) y el tratamiento con dexametazona (glucocorticoide sintético) indican que los glucocorticoides regulan negativamente los niveles del RNAm de la POMC en el LA de la hipófisis de rata. En el LNI, los glucocorticoides no tienen ningún efecto sobre los niveles del RNAm POMC (23).

La administración de haloperidol (antagonista de la dopamina) incrementa los niveles del RNAm de la POMC en el LNI de la hipófisis de rata, efecto no observado en el LA (15).

Se propone que la regulación es de tipo deferencial, y podrían estar participando los receptores para glucocorticoides en el LA y para la dopamina en el LNI (45).

Respecto a la PEF se sugiere una regulación a nivel transcripcional que involucra factores dopaminérgicos.

Como resultado del tratamiento crónico con haloperidol, se observó un incremento en los niveles del RNAm PEF en el estriado de rata; tal efecto no fue observado en hipocampo, hipotálamo y corteza (148).

En relación al sistema de la PDNF no existen datos que indiquen su regulación a nivel transcripcional.

Traducción

En sistemas libres de células se ha realizado la síntesis de la POMC mediante la traducción del RNAm POMC. La proteína sintetizada en este sistema, resulta ser ligeramente más grande que cuando la traducción se realiza en presencia de células, con 25 aminoácidos adicionales en su extremo amino terminal (44). Se ha sugerido que esta secuencia corresponde al "péptido señal" que en analogía con otras proteínas es eliminado durante el paso de la POMC recién sintetizada por el RER en las células intactas (98).

Se ha encontrado que el stress agudo afecta la tasa de síntesis de la POMC. Mediante experimentos de pulso-caza en cultivos de células de hipófisis anterior de rata, sometidas previamente a stress agudo, se observó un incremento en la síntesis de la POMC. Así mismo se detectó un decremento paralelo en un 25% de B-end y ACTH, dos horas después del tratamiento, el contenido de B-end y ACTH en el LA se restablece (23).

Con la utilización de un antisuero dirigido hacia la región aminoterminal de la POMC, que se supone corresponde al "péptido señal" (2) se encontró que la cantidad medi-

ble de "péptido señal POMC" y su proporción con la B-end total fue significativamente incrementado. Estos hallazgos son indicadores de que la separación del "péptido señal" de la POMC ocurre como un evento co-traducciona (21, 23).

Respecto al sistema de la PEF; los estudios mediante la incorporación de aminoácidos marcados radioactivamente a las encefalinas y la inhibición de la síntesis proteica con cicloheximida, indicaron que las encefalinas podían derivarse de una molécula de mayor peso molecular, sintetizada ribosomalmente y que daba lugar a las encefalinas en un periodo aproximado de dos horas (50, 97).

Con la cromatografía de filtración en gel, para los extractos ácidos del cuerpo estriado de bovino, se intentó identificar al precursor de las encefalinas. Se encontró inmunoreactividad (IR) para éstas, en material correspondiente a alto peso molecular. Lo cual indicaba que podría tratarse del precursor, sin embargo las concentraciones detectadas fueron muy bajas, dificultando su caracterización (83). Tres años después se detectaron altas concentraciones de IR para encefalinas en tejido adrenal de bovino (128).

El primer acercamiento para la identificación del precursor de las encefalinas se obtuvo con los trabajos de Lewis y col. (1980). Con los extractos ácidos de gránulos cromafines de médula adrenal de bovino (MAB); la cromatografía de filtración en gel, generó material de alto peso molecular que mediante digestión enzimática dio lugar a las encefalinas en una proporción de 7 ME: 1 LE (82).

Se ha propuesto que las enzimas que procesan a la POMC en los diferentes lóbulos de la hipófisis podrían ser muy semejantes. Sin embargo, podrían diferir en su preferencia o selectividad por los aminoácidos que rompen (90). Esta posibilidad se basa en las diferencias observadas en el patrón postraducciona l entre el lóbulo intermedio y el lóbulo anterior de la hipófisis. En el primero los principales productos de la POMC son la alfa-MSH y otros péptidos relacionados con la B-end. En el lóbulo anterior los productos principales son la alfa-LPH y la B-end (figura 4) (23).

En hipófisis intermedia, Glembotski (1981) ha demostrado que el rompimiento de la POMC hacia la Beta-LPH, ocurre durante el paso por el RER/Golgi. La conversión de la Beta-LPH hacia B-end tiene lugar en los gránulos secretorios (36).

En cuanto a las modificaciones enzimáticas de los productos finales de la POMC, se han encontrado modificaciones de glicosilación (26), acetilación (139), fosforilación (6).

La B-end y sus fragmentos 1-26 y 1-27 están N-acetilados en la hipófisis intermedia, pero no en la hipófisis anterior de la rata y cerdo (23, 91).

La acetilación amino terminal (N-acetilación) de la alfa-MSH (6, 23) es necesaria para su actividad biológica. Para la B-end, la N-acetilación ocasiona la eliminación de su actividad opioide en el lóbulo intermedio de la hipófisis (161). Se infiere que la fosforilación ocurre poco después

PROOPIOMELANOCORTINA

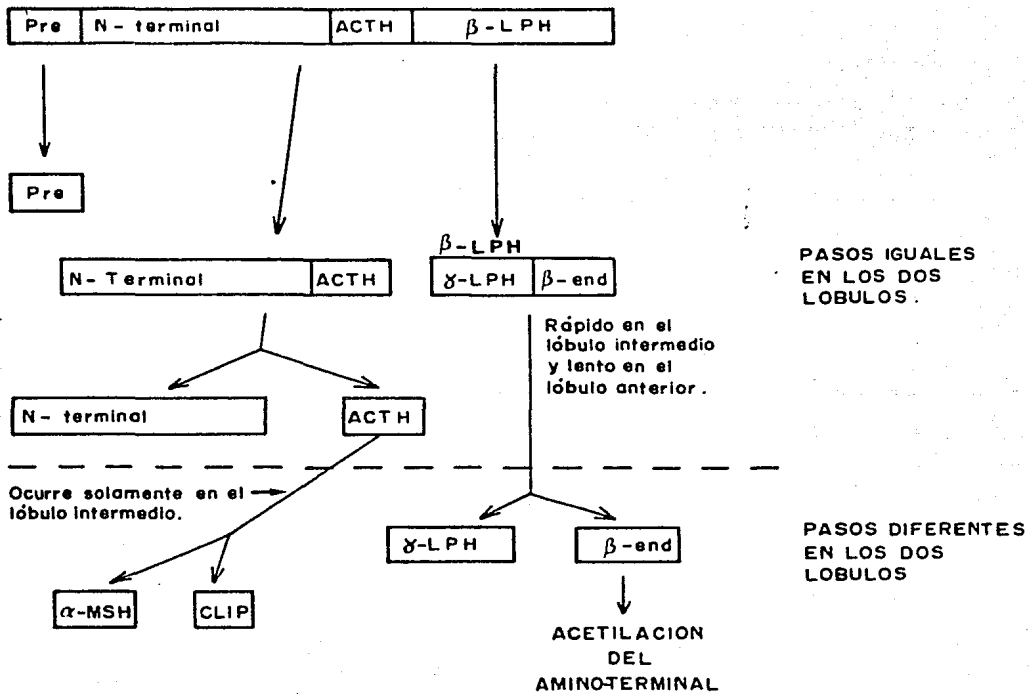


Figura 4: En este esquema se anotan algunas observaciones sobre el procesamiento de la POMC hacia sus productos finales. Se hace notar las diferencias en cuanto a la velocidad y los productos finales en el lóbulo intermedio y el lóbulo anterior. Procesamiento de la proopiomelanocortina en el lóbulo anterior e intermedio de hipófisis de rata y ratón. Abreviaciones: ACTH=hormona adrenocorticotrópica, Pre=péptido señal, N-terminal=amino terminal, β -LPH=beta lipotropina, β en=beta endorfina, γ -LPH=gama litropina, α MSH=alfa hormona estimulante de los melanocitos, CLIP=péptido corticotropina like del lóbulo intermedio.

Tomado de Douglas et al., 1984 ().

de la síntesis de la POMC, presumiblemente en el RER o el Golgi (6, 91).

Asumiendo que pares de aminoácidos básicos son señales de rompimiento proteolítico y en base a la estructura primaria de la PEF, se sugieren rompimientos potenciales a nivel de cuatro copias de ME y una copia de LE, así como del octapéptido (OC) (Metionina-Encefalina-Arg⁶-Gli⁷-Leu⁸) y el HE (48) (figuras 1 y 5).

Adicionalmente se han identificado varios péptidos que contienen encefalinas de la MAB (tabla 1 y figura 6).

En la mayoría de los casos los péptidos que contienen encefalinas aparecen en la estructura del precursor como secuencias limitadas por pares de aminoácidos básicos, excepto en el caso de los péptidos BAM 12P y BAM 22P, que se originan por rupturas en aminoácidos que no son los de procesamiento típico (149). Otro caso es el de la metorfamida, un péptido de ocho aminoácidos resultante del rompimiento de un solo residuo de arginina (Arg) (156).

Los péptidos BAM 12P, 22P, péptido F, amidorfan y BAM 18P también se han encontrado en el cerebro de bovino, pero en muy bajas concentraciones (47).

Enzimas consideradas como responsables del procesamiento de la PEF fueron aisladas y purificadas. La ruptura de la PEF a nivel de aminoácidos básicos se atribuye a una enzima de la familia de la kalicreína (21). La remoción de los aminoácidos básicos en la región carboxilo terminal de los péptidos separados por la endopeptidasa se adjudica a

PROENCEFALINA (P E F)

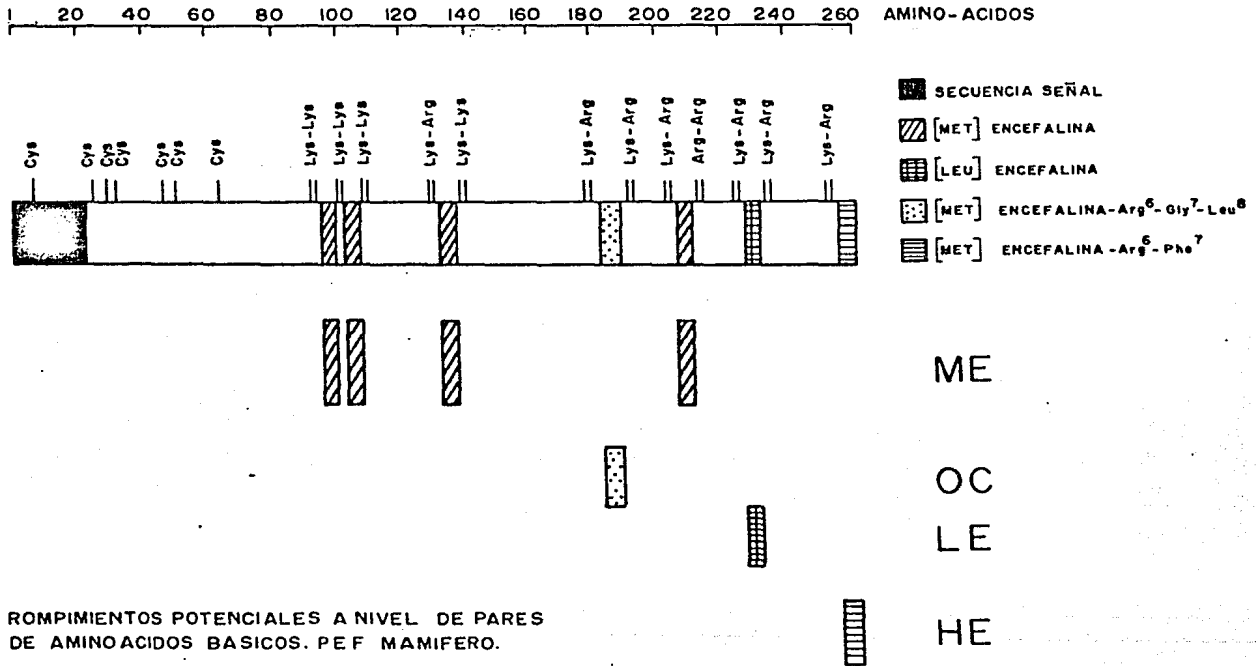
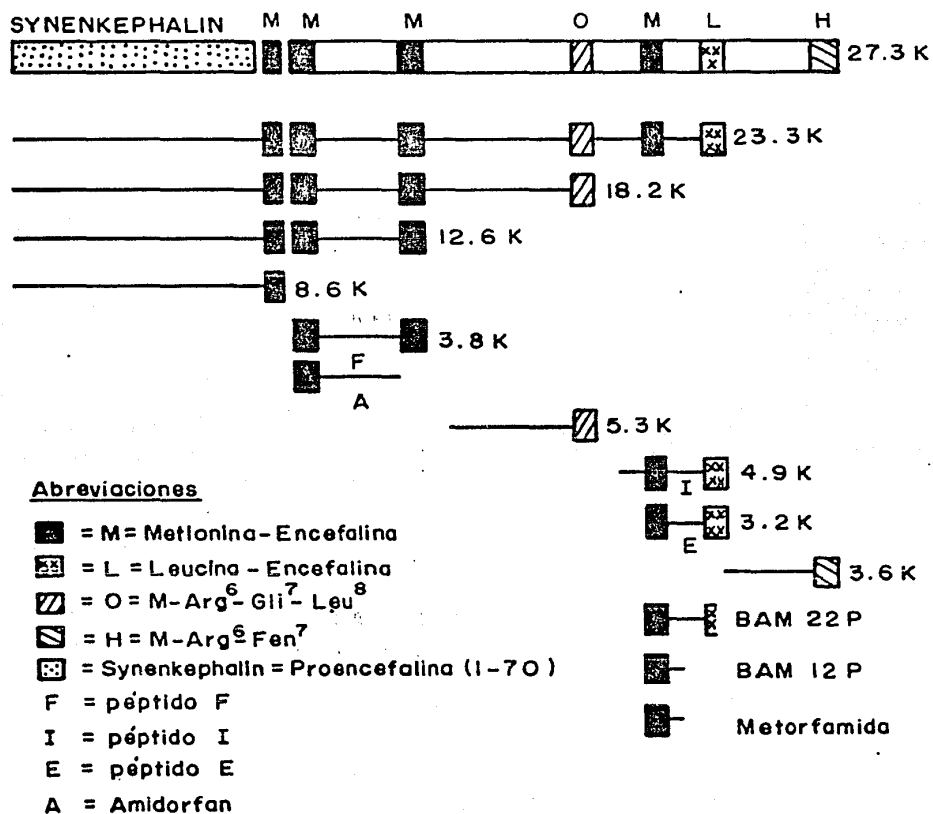


Figura 5: PROENCEFALINA (PEF) de Mamífero. Se indican los rompimientos proteolíticos potenciales a nivel de pares de aminoácidos básicos que, generan a las encefalinas, el octapéptido y el heptapéptido. Abreviaciones: Cys=Cisteína, Lys=Lisina, Arg=Arginina, ME=Metionina Encefalina, OC=Octapéptido (ME-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸), LE= Leucina Encefalina, HE=Heptapéptido (ME-Arg⁶-Fen⁷).

FIG. 6 PROENCEFALINA Y LOS PEPTIDOS QUE CONTIENEN ENCEFALINAS EN LA MEDULA ADRENAL.



Noda et al. 1982.

Patey et al. 1984.

Kilpatrick et al. 1982.

Jones et al 1982b.

Jones et al. 1982b; Lewis et al. 1980b.

Kimura et al. 1980.

Seizenger et al. 1985.

Jones et al. 1982a.

Stern et al. 1981.

Kilpatrick et al 1981.

Stern et al. 1981.

Mizuno et al. 1980a.

Mizuno et al. 1980b.

Matsuo et al. 1983.

una carboxipeptidasa dependiente de cobalto (33).

En cuanto a las modificaciones enzimáticas de los péptidos derivados de la PEF hay mucho menos información que para el caso del sistema de la POMC, teniéndose evidencias solamente de modificaciones de amidación en el caso de dos péptidos. El amidorfan y la metorfamida que son amidados en su extremo carboxilo terminal (131, 156).

Se propone que parte de la LE en la hipófisis de rata, pero no en el cerebro, puede sufrir N-acetilación, con lo cual pierde su actividad opioide (130).

Las evidencias indican que la PEF en la médula adrenal y en el cerebro de bovino es estructuralmente idéntica o casi idéntica, en cuanto a la secuencia aminoácida. El RNAm de la PEF en ambos tejidos, tiene un mismo tamaño, con cerca de 1400 nucleótidos (115). A partir del núcleo caudado de bovino se aisló un péptido de 70 aminoácidos, llamado Sin-enkephalin (Sin-enk) el cual originalmente se encontró en gránulos cromafines de bovino; mismo que resultó ser idéntico a los aminoácidos 1-70 de la PEF de la MAB (89). Las enzimas que procesan a la PEF en la médula adrenal, también se han detectado en el cerebro. Sin embargo, a pesar de tales semejanzas, los pasos y la velocidad del procesamiento en cada tejido parecen ser diferentes ya que en el cerebro no se han identificado todos, ni los mismos péptidos intermediarios provenientes de la PEF detectados en la médula adrenal (31, 52, 88, 115).

Se ha planteado que en cerebro, el procesamiento de la PEF parece ser más completo que en médula adrenal. En el primero la PEF se procesa más rápidamente, encontrando intermediarios de alto peso molecular en cantidades no significativas. Lo cual sugiere que las encefalinas y otros péptidos opioides de bajo peso molecular, como el HE y OC, podrían ser los principales productos de la PEF en el cerebro (116). A diferencia de la médula adrenal, donde la cantidad de péptidos de alto peso molecular que contienen encefalinas respecto a las encefalinas libres, es relativamente mayor (31).

En base a la anatomía del sistema hipotálamo-hipofisiario de rata, se encontró que la PEF se procesa durante el transporte axónico. Los intermediarios de alto peso molecular que contienen encefalinas están en pequeñas cantidades y son distintos a los de MAB (5, 69, 88). En este sistema, los péptidos que contienen encefalinas se encontraron predominantemente en núcleo supraóptico (NSO). En la neurohipófisis fueron casi exclusivamente encefalinas libres. Los hallazgos en este trabajo indicaron que el material de alto peso molecular con inmunorreactividad (IR) a ME en NSO, carece de la región amino terminal de 70 aminoácidos (Sinenk) de la PEF. Se sugiere la pérdida del tal región en un estado inicial del procesamiento, generado por proteínas de alto peso molecular que conservan la región carboxilo terminal de la PEF y que en la médula adrenal, la región amino-terminal se separa como un evento posterior a la eliminación de la

región carboxilo-terminal. Los autores plantean que las diferencias entre estos dos tejidos podría resultar de diferencias en la forma molecular de la PEF o bien de diferencias en las reacciones proteolíticas durante el procesamiento del precursor (88).

Por otro lado los péptidos Beta-neoendorfina (100), Dinorfina A (1-17) (30, 37) y Leumorfina (105), se generan a partir de la PDNF por rompimiento a nivel de pares aminoácidos básicos. Esto indicaría la participación de enzimas semejantes a las propuestas para la PEF. La rimorfina (68) se libera por rompimiento en un sólo residuo de Arg. De la misma forma se genera la Dinorfina 1-8 (101). En ambos casos se sugiere la participación de una enzima del tipo de la tripsina.

Los estudios en hipófisis de rata han indicado que los péptidos derivados de la PDNF son más abundantes en la hipófisis posterior. Se propone que este precursor se procesa diferencialmente. Aparentemente la PDNF en el lóbulo anterior de la hipófisis genera formas moleculares de alto peso molecular como productos principales y en el lóbulo posterior proporciona formas de bajo peso molecular; en ambos lóbulos el material contiene en su secuencia una o más copias de LE (132) (figura 7).

Secreción

Se sabe que los productos finales de los tres sistemas de péptidos opioides se liberan. Sin embargo, si se considera que cada precursor opioide puede originar varios

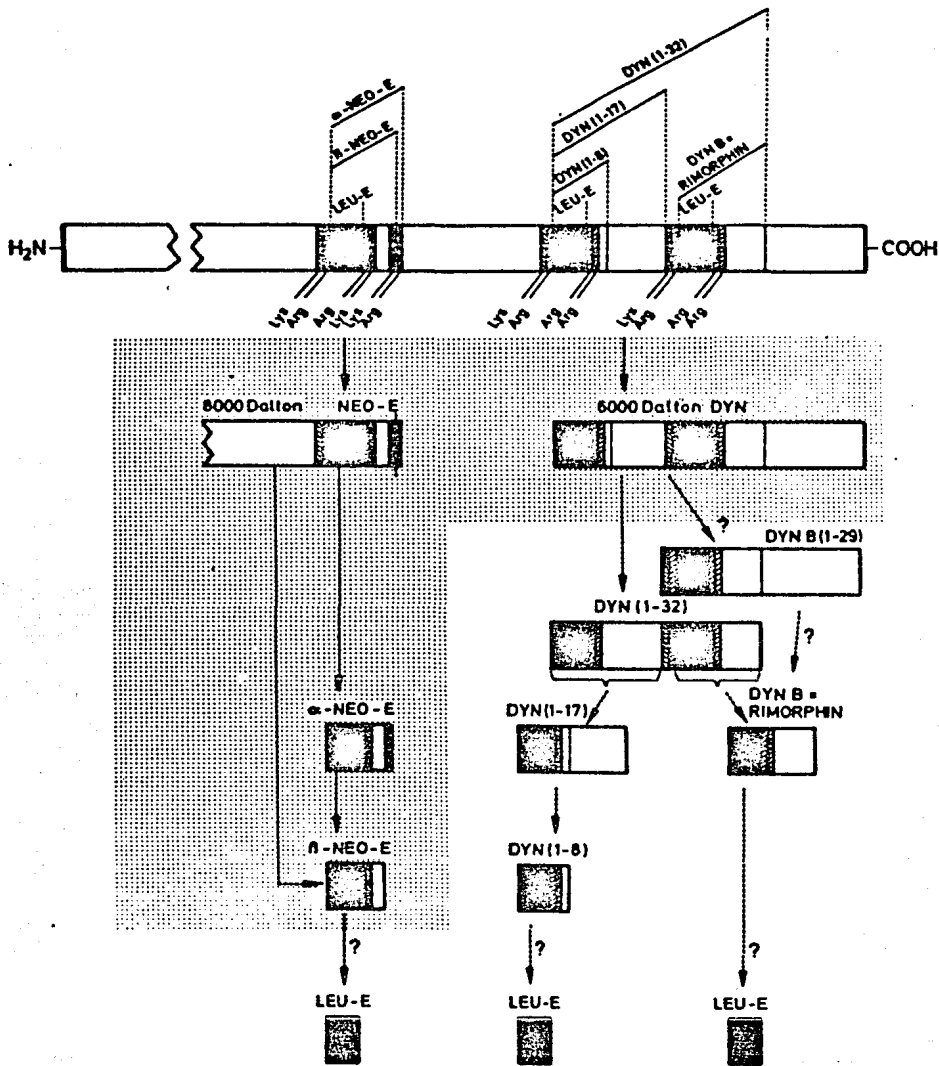


Figura 7: Posible procesamiento proteolítico de la Prodinorfina (PDNF) en la hipófisis. La figura muestra la representación esquemática de la porción carboxilo terminal de la PDNF, donde todas las secuencias peptídicas opioides están contenidas dentro de los 85 aminoácidos carboxilo terminal del precursor de 30.000 daltons. e indican las posiciones de los pares de aminoácidos básicos (Arg Lys) y de las tres secuencias de la Leu-E. En el área punteada se muestran los productos del procesamiento que son enzimáticamente liberados de la molécula precursora en el lóbulo anterior de la hipófisis. Abreviaciones: H₂N=Amino terminal, COOH=Carboxilo terminal, Lys=lisina, Arg=arginina, Leu-E=Leucina Encefalina, B-NEO-E=beta neoendorfina, α -NEO-E=alfa neoendorfina, DYN (1-8)=dinorfina (1-8), DYN (1-17)=dinorfina (1-17), DYN (1-32) = dinorfina (1-32), DYN B o RIMORPHIN = dinorfina B o rimorfina.

productos que varían en especificidad y actividad biológica; resulta muy crítico determinar qué productos y dentro de qué circunstancias son liberados. Dado que no se tiene, a priori, forma de determinar el patrón de liberación o su regulación biológica, es necesario desarrollar modelos de estudio para abordar este problema (21).

En el caso del sistema de la POMC se propone un modelo para estudios de liberación utilizando un cultivo primario del lóbulo anterior de hipófisis donde se encontraron factores endógenos de liberación. Con este sistema se logra la liberación diferencial de material de bajo peso molecular, como la B-end (21).

3.0 PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

Otro aspecto de particular importancia en relación a los péptidos opioides es que, no solamente se encuentran en los mamíferos, sino que también se han reportado en otros organismos a lo largo de la escala filogenética, desde un organismo unicelular (80), pasando por invertebrados, protozoarios y todas las clases de vertebrados, incluyendo el hombre (tabla 2).

El trabajo de Pert y col. (1974) (112) sobre la distribución filogenética de los receptores opiáceos, aunado al trabajo de Simantov y col. (1976) (133), sobre la medición de la actividad de las encefalinas "purificadas" y determinación de la unión a receptores opiáceos en las preparaciones de tejido nervioso de diferentes vertebrados e

invertebrados sugirieron que los receptores opiáceos y las encefalinas sólo estaban presentes en el grupo de los vertebrados. Sin embargo, posteriormente se obtuvieron evidencias de la presencia de péptidos opioides o sustancias estructuralmente muy parecidas a éstos, en varios grupos de invertebrados (tabla 2) (118). La mayoría de las evidencias tanto en vertebrados, como en invertebrados se han obtenido para las encefalinas y B-end por medio de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

Péptidos relacionados con la POMC y PEF se han detectado en invertebrados, protocordados y todas las clases de vertebrados que se han revisado. Por otro lado, solamente para los anfibios se han detectado péptidos representantes de los tres sistemas de péptidos opioides evidenciados en mamíferos. Respecto al sistema de la PDNF, al igual que en las secciones precedentes, la información disponible es más escasa.

En el caso particular de los anfibios se ampliará un poco la información, puesto que, este trabajo se efectuó con el encéfalo y la hipófisis de un anfibio; el urodelo Ambystoma mexicanum.

La presencia de la POMC y sus derivados ha sido mostrada en el lóbulo neurointermedio de la hipófisis de la rana Xenopus laevis y la Rana ridibunda. E inclusive en el último caso se ha detectado material acetilado, proponiendo un esquema de procesamiento que incluye intermediarios de alto peso molecular como la BETA-LPH y ACTH que se procesan

Tabla 2. PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA
PROOPIOMELANOCORTINA

CLÁSE	ORGANISMO	TEJIDO	REFERENCIA
REPTILES	Lagarto	Hp. y Cerebro m	22,24
	Lagarto	H. interm.	20
ANFIBIOS	Rana	H. interm.	150
	Rana	Est. POMC	93
PECES	Teleosteo	Pro y meta-adenohip.	27
	Salmón	Hipófisis	61,146
PROTOCORDADO	Ascidia	Comp. Neural	114
INVERTEBRADO	L de t.	Gán. cer.	3
UNICELULAR	<u>T. puriformis</u>	Extractos ac.	80
PROENCEFALINA			
AVES	Pichón	Cerebro	4
	Pollo domes.	Telencéf.	119
REPTILES	Tortuga	Cerebro	87
	Lagarto	Cerebro	
	Lagartija	Cerebro	
	Caimán	Telencéf.	9
	Tortuga	Retina	
ANFIBIOS	Rana	Glan, Adr.	78
	Rana	Est. PEF	94
	Sapo	Cerebro	65
	Salamandra	Retina	155
PROTOCORDADO	Ascidia	SN	35
INVERTEBRADOS	Cangrejo	Org.Nh y tallo oc.	56
	Insectos	Extractos	118
	L de t.	Gán. cer.	3,125
	Sanguijuela	SNC y SNP	76,164
	Molusco	SNC	81
	Pulpo	Vena cava	
PRODINORFINA			
ANFIBIOS	Sapo	SNC	16

Abreviaciones: Hp.=hipotálamo; m=medio; H=hipófisis; interm.=intermedia; Est=estructura; POMC=proopiomelanocortina; Pro y metaadenohp=pro y metaadenohipófisis; Comp.=complejo; Gan.cer.=ganglio cerebral; ac.=ácidos; Telencéf=telencéfalo; Glan.Adr.=glándula adrenal; SN=sistema nerviosos; Org.Nh=órgano neurohemal; oc=ocular; SNC=sistema nervioso central; SNP=sistema nerviosos periferico; L det=lombriz de tierra.

hacia las melanotropinas y B-end (150). Más recientemente incluso, se ha obtenido la secuencia nucleotídica del DNA complementario para la POMC de la rana Xenopus laevis (93).

Mediante IHQ y análisis bioquímico, se ha mostrado la presencia de las encefalinas en los gránulos cromafines de rana (77). Con antisueros dirigidos hacia el extremo amino terminal de la PEF (Sin-enk) de mamíferos, se sugiere la existencia de proteínas semejantes a la PEF en las células cromafines de la Rana ridibunda (78).

La cromatografía de filtración en gel de extractos ácidos de cerebro de sapo Buffo marinus indicó la presencia de ME, LE y HE libres. También se encontró IR a encefalinas en material de alto y bajo peso molecular. Los autores plantean que la presencia del HE, que corresponde al extremo carboxilo terminal de la PEF de mamíferos, es una evidencia de que la PEF también existe en los anfibios. La concentración de ME fue mucho mayor que la de LE y casi cuatro veces más que el HE. La proporción ME:HE coincidió con lo encontrado en mamíferos, lo cual no sucede con la proporción ME:LE (65).

Otro anfibio, la rana Xenopus laevis se utilizó para examinar, por medio de técnicas de biología molecular, el gene que codifica para la PEF; encontrando que la estructura primaria de los principales exones de los genes de los PEF en Xenopus laevis codifican para siete secuencias de ME, pero para ninguna secuencia de LE. Dentro de la secuencia de la PEF de Xenopus laevis las posiciones de ME son las mismas que en la PEF de mamíferos. El lugar correspondiente

a la LE, está ocupado por una copia de ME. En la posición del OC hay una secuencia de ocho aminoácidos limitada por pares de aminoácidos básicos; pero en este caso, el octavo aminoácido es la Tir, que en mamíferos corresponde a la Leu. La secuencia de HE al igual que en mamíferos se localiza en el extremo carboxilo terminal de la PEF. Las secuencias de ME, HE y Metionina-Encefalina-Arg⁶-Gli⁷-Tir⁸, dentro de la PEF de Xenopus laevis, están limitadas por pares de aminoácidos básicos y su proporción es 5ME: 1LE: 1 Metionina-Encefalina-Arg⁶-Gli⁷-Tir⁸.

En el caso del sistema de la PDNF se ha descrito la presencia de IR para Dinorfina 1-13 en la hipófisis, cerebro y médula espinal del sapo Buffo marinus. Se determinó el contenido de IR-Dinorfina y sus patrones de distribución molecular. Las concentraciones más altas de IR-Din se encontraron en el lóbulo neurointermedio (LNI) de la hipófisis, mientras que las concentraciones detectadas en el cerebro y la médula espinal representaron el 1% de lo encontrado en el LNI.

Además de estos estudios, hay evidencias de la existencia de receptores opiáceos en sistemas neuronales de anfibios. Inicialmente se reportó que los receptores opiáceos en anfibios, presentaban una afinidad ligeramente menos sensitiva a la observada en rata (11). Más tarde RÜegg presentó datos sobre la solubilización parcial de receptores opiáceos al tratar las membranas de células nerviosas de cerebro de sapo con digitonina (124). Simon describió la so-

lubilización de receptores opiáceos a partir del cerebro de la Rana esculenta encontrando sitios de unión tipo "mu", "delta" y "kappa". Las membranas cerebrales de esta rana solubilizadas con digitonina, dieron origen principalmente a receptores tipo "kappa"; los cuales fueron separados de los otros dos tipos (134).

Todos los reportes sobre receptores y péptidos opioides en anfibios hasta aquí mencioandos se han efectuado en anfibios pertenecientes al Orden de los Anuros (sapos y ranas). El único trabajo efectuado en un urodelo hasta la fecha es el de Watt (1985) (155) donde se determinó IR para encefalinas en las células amacrinas de retina de larvas de salamandra Ambystoma tigrinum mediante IHQ.

4.0 BIOLOGIA DEL AJOLOTE Ambystoma mexicanum

4.1 Características generales del ajolote

Clasificación taxonómica: (158,166')

Reino	Animal
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Tetrapoda
Clase	Anfibia
Orden	Urodela (Caudata)
Suborden	Ambystomoidea
Especie	<u>Ambystoma mexicanum</u> (<u>Siredon mexicanum</u>)

Durante la evolución de los vertebrados, un cambio notable fue el paso de un tipo de desplazamiento mediante natación hacia la locomoción en cuatro patas, y de la respiración por medio de branquias a la respiración por pulmones. Es en la clase de los anfibios donde se observa esta etapa de transición.

Los anfibios son organismos que en la mayoría de los casos durante su vida larvaria viven en el agua y durante su vida adulta son terrestres. Este cambio de medio ambiente está asociado a cambios morfológicos y fisiológicos importantes que permiten al animal desarrollarse en medios ambientes tan distintos.

Los Urodelos (salamandras y tritones) se distinguen de los otros dos órdenes de anfibios (Anura: sapos y ranas) y (Apoda: cecilias) por la forma del cuerpo:

a) En el cuerpo de los Urodelos puede distinguirse bien la cabeza, el tronco y la cola permanente.

b) Las larvas son estructuralmente muy parecidas a las formas adultas.

c) Tanto las larvas como los adultos presentan dos pares de extremidades débiles.

Las salamandras por su forma externa son semejantes a los antiguos anfibios que se originaron directamente de los peces. Con cuerpo alargado, pero grueso, la musculatura del tronco es potente y la cola está desarrollada ayudando a la natación (122).

El Ajolote Ambystoma mexicanum que habita en los canales de Xochimilco (México, D.F.) pertenece al Orden de los Urodelos; en su medio natural se encuentra como una forma neoténica, la cual no presenta evidencias externas de metamorfosis, pero que es madura sexualmente y se reproduce conservando su morfología de larva (138, 158). Parece probable que las aguas frías de los lagos montañosos y la escasez de iodo en el agua son, en parte las responsables de la neotenia en su medio natural. La metamorfosis es fácilmente inducida en estos organismos por inyecciones de extractos tiroideos y hormonas tiroideas.

Se considera muy probable que de la especie Ambystoma mexicanum existan diferentes subespecies o razas geográficas (166').

Estudios bioquímicos han indicado cambios normalmente asociados a la metamorfosis de los anfibios en el Ajolote; un ejemplo es el cambio de la hemoglobina, de una forma larvaria característica, hacia una forma adulta, durante el desarrollo del Ajolote (24, 25).

Los ambystomideos de México representan tres géneros y cerca de una docena de especies. La especie históricamente más encontrada y probablemente la más comúnmente usada como alimento es el Ajolote oscuro (Ambystoma mexicanum), que aparentemente está restringido al Lago de Xochimilco.

Las larvas de Salamandra tigrinum de color más claro que las de Xochimilco, distribuidas en E.U., excepto en el extremo Este, también se encuentran en el Suroeste de

Canadá y en lugares cercanos a las ciudades de Puebla y México, son referidos en casi todos los casos como Ajolote del tipo de los de Xochimilco, aunque en realidad se trata de otra especie. En el Lago Lerma del Valle de Toluca hay una especie muy parecida a la de Xochimilco en cuanto a color.

El Ajolote ha sido utilizado para diferentes tipos de investigación y es conocido con el nombre científico de Ambystoma mexicanum, igualmente aplicable a todos los estados de desarrollo; pero, su nombre vernáculo "Axolotl" o Ajolote ha sido más estable. El nombre Axolotl es de origen azteca y su significado es interpretado como:

Mostruo del agua
Duende del agua
Perro del agua
Gamelo del agua
Sirviente del agua, etc.

La relación de "Xolotl" como una deidad, con el Axolotl es evidenciada en el contexto de lo "feo" desde los primeros tiempos. En relación al mito del Dios Xolotl, que se supone adoptaba formas "feas", como monstruo o como agave del doble tallo. El Axolotl podría representar otra forma fea del Dios, sólo que en este caso como habitante del agua. La adopción de esta forma sería como tentativa de escapatoria del Dios o en relación, según la leyenda, a que el Dios Xolotl presidía el nacimiento de gemelos y monstruos (138).

4.2 El Sistema Nervioso Central (SNC) del Ajolote Estructuralmente en el cerebro de los Urodelos,

incluyendo al Ajolote, se puede distinguir las tres regiones principales del encéfalo de los vertebrados "superiores".

Encéfalo	Prosencéfalo	Telencéfalo	Bulbos olfatorios
	Mesencéfalo	Diencéfalo	Hemisferios cerebrales
	Rombencéfalo		

Se ha planteado que evolutivamente cada región pudo haberse desarrollado en asociación con alguno de los tres principales órganos de los sentidos. El sentido del olfato está relacionado principalmente con el prosencéfalo. El sentido de la vista con el mesencéfalo. El sentido del oído, cambios de presión y equilibrio, con el rombencéfalo.

En el rombencéfalo se encuentran los centros de asociación con los nervios que llegan a la línea lateral y el oído interno en los vertebrados acuáticos (122, 158).

Durante la evolución del SNC de los vertebrados encontramos a los anfibios en una posición intermedia, en donde se conservan las características de los peces, pero además empiezan a manifestarse los cambios que llevaron al desarrollo, tal como se presenta en mamíferos.

En anfibios, cuyos hemisferios cerebrales están poco desarrollados los principales centros de actividad nerviosa se encuentran en el tallo cerebral (mesencéfalo-rombencéfalo). En el techo del mesencéfalo existe un gran centro de coordinación e iniciación de la actividad motora, es principalmente un centro visual, pero recibe estímulos de todos los demás centros de asociación; de esta zona salen

órdenes para los centros y columnas motoras.

Conforme se asciende en la escala filogenética de los vertebrados, la región del techo pierde importancia, a favor de los hemisferios; en los mamíferos la región del techo ya es secundaria.

En peces y anfibios con cola, la región del bulbo (rombencéfalo), contiene los cuerpos celulares de la células gigantes del Mauthner que recorren toda la médula espinal y controlan los movimientos rítmicos del tronco y la cola, fundamentales para el desplazamiento.

En los peces la materia gris sólo existe en las paredes internas adyacentes a los ventrículos y la materia blanca forma la superficie externa. A medida que se acerca al encéfalo y se asciende en la escala de los vertebrados; las materias gris y blanca van perdiendo su posición original y se entremezclan en mayor o menor grado. En los hemisferios cerebrales, el techo del mesencéfalo y el cerebro de los vertebrados "superiores", la posición de estas dos capas está invertida, constituyendo la corteza cerebral. En los anfibios, es donde el cambio de la posición de la materia gris hacia la periferia empieza a notarse; donde algunas células de la materia gris se han desplazado hacia la periferia.

En los anfibios el tálamo propiamente dicho (paredes del diencéfalo) es una zona de importancia secundaria, aunque sigue siendo un centro de relevo para los impulsos que van a los hemisferios cerebrales. La parte dorsal del tálamo tiene poca importancia en los anfibios, mientras que

en los mamíferos las funciones del tálamo dorsal son fundamentales (122).

El género Ambystoma es intermedio entre las especies "inferiores" y "superiores" de la Clase de los Anfibios: se parece mucho a los peces. Sin embargo, su cerebro como un todo, está organizado en un plano mayor, lo cual hace posible su comparación con el de los reptiles y mamíferos. Las subdivisiones más grandes en el cerebro humano pueden identificarse en el Ambystoma, aunque existen remarcables diferencias en forma y tamaño relativo (46).

5.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En diferentes tejidos de vertebrados e invertebrados se ha identificado diversos péptidos opioides biológicamente activos (tabla 2). Actualmente se acepta de manera general la existencia de tres moléculas precursoras, las cuales generan a todos los péptidos opioides conocidos, mismas que se describen como POMC, PEF y PDNF.

Las encefalinas se forman a partir de la PEF, sin embargo; existe la posibilidad de producir LE como producto final proveniente de la PDNF.

La presencia de péptidos opioides en anfibios se describe por vez primera en el cerebro del sapo Buffo marinus, encontrándose inmunorreactividad para HE, encefalinas y péptidos de alto peso molecular que contienen encefalinas. Sin embargo, no se detectó inmunoreactividad para el OC. Este último constituyente también de la PEF de mamíferos. La pro-

porción ME:HE en el cerebro de sapo es de 3.5:1, similar a lo reportado en tejidos de mamíferos (65).

Poco tiempo después se logró identificar por métodos inmunohistoquímicos a las encefalinas y a la porción 1-70 de la PEF de mamífero, denominada Sin-enkephalin, en la glándula adrenal de la Rana ridibunda (77,78)

La identificación de Sin-enkephalin, HE, encefalinas libres e integradas a péptidos de alto peso molecular es consistente con la idea de una forma anfibia de PEF. Esta idea se vio confirmada al obtenerse la secuencia nucleótida del gene que codifica para la PEF en Xenopus laevis. La molécula no presenta ninguna secuencia de LE y contiene en su estructura 5 copias de ME, una de HE en su extremo carboxilo terminal y una de Met-encefalina-Arg⁶-Gli⁷-Tir⁸ (esta secuencia se encuentra en la misma posición que el OC en la PEF de mamíferos, pero contiene una tirosina en lugar de Leucina en la octava posición). Los autores de este trabajo plantean que durante la evolución la ME precede a la LE dentro de la PEF. (94).

No obstante, existe una discrepancia importante en los datos presentados. Es demostrada la presencia de LE en Buffo marinus, sin embargo, la secuencia nucleótida que codifica para la PEF no contiene una sola secuencia de LE. Esto permite sugerir que la LE proviene de una molécula precursora diferente; dicho precursor podría ser semejante a la PDNF, planteamiento que encuentra apoyo en la identificación de dinorfina 1-3 en el SNC de Buffo marinus (16).

En México existen anfibios Urodelos y Anuros, de estos últimos parten la mayor cantidad de investigaciones bioquímicas y fisiológicas, mientras que la biología de los Urodelos es poco conocida. En la mayoría de los casos han sido utilizados principalmente como modelo del estudio endócrino de la metamorfosis. Por lo tanto es importante iniciar el estudio bioquímico del Sistema Nervioso de una especie Urodela mexicana; como el Ajolote Ambystoma mexicanum. En este caso, partiendo de un estudio sobre la biosíntesis de las encefalinas en el cerebro de tal anfibio.

En función de las evidencias que demuestran la presencia de péptidos opioides pertenecientes a los sistemas de PEF y PDNF en el cerebro de anfibios Anuros; la hipótesis de este trabajo es que la Metionina y Leucina-Encefalina existen en el cerebro del Urodela Ambystoma mexicanum y que tales neuropéptidos provienen de precursores de mayor peso molecular en el cerebro de esta especie.

Los objetivos principales son:

1. Demostrar la presencia de Metionina y Leucina-Encefalina en las siguientes estructuras del cerebro del Ajolote Ambystoma mexicanum: telencéfalo, diencéfalo-mesencéfalo, rombencéfalo e hipófisis.

- 2a. Analizar la distribución molecular de péptidos que contienen encefalinas. Mediante la revisión del perfil de distribución por pesos moleculares del material con inmunoreactividad para encefalinas en cromatografía de filtración molecular; a partir de los extractos ácidos correspondientes a cada una de las estructuras ya mencionadas.

2b. Comprobar que las encefalinas se derivan de péptidos de mayor peso molecular, mediante la digestión enzimática de los eluatos resultantes de la cromatografía de filtración en gel.

Todo esto con el propósito de contribuir al estudio de la biosíntesis de las encefalinas en el SNC de los vertebrados; suponiendo que los procesos biosintéticos de éstas en el cerebro de Ambystoma mexicanum podrían ser identificables con menor dificultad que en el caso del cerebro de vertebrados superiores como los mamíferos, donde la complejidad en la organización del SNC y de los sistemas de péptidos opioides es relativamente mayor. Así como para iniciar un estudio sobre las características bioquímicas del SNC Del Ajolote.

6.0 MATERIAL Y METODOS

Mantenimiento de los animales

Para efectuar este trabajo se utilizaron 40 Ajolotes (Ambystoma mexicanum) de ambos sexos, provenientes de Lago de Xochimilco. La longitud de los animales fue de 18 a 20cm y el peso de 60 a 100g. Los Ajolotes se mantuvieron en el Laboratorio, hasta su utilización, en peceras con agua de clorinada, un colorante antihongos y un sistema de aireación de agua a una temperatura de 18 - 20°C, alimentándolos con peces pequeños vivos y polvo de moscos.

Disección de cerebro

En la primera parte de este trabajo se utilizaron 20 Ajolotes, que se sacrificaron por decapitación. El cerebro se extrajo cortando el cráneo por la parte dorsal (obte-

niéndose desde los bulbos olfatorios, hasta el inicio de la médula espinal).

Trabajando sobre una superficie fría (4°C) se separaron cuatro regiones:

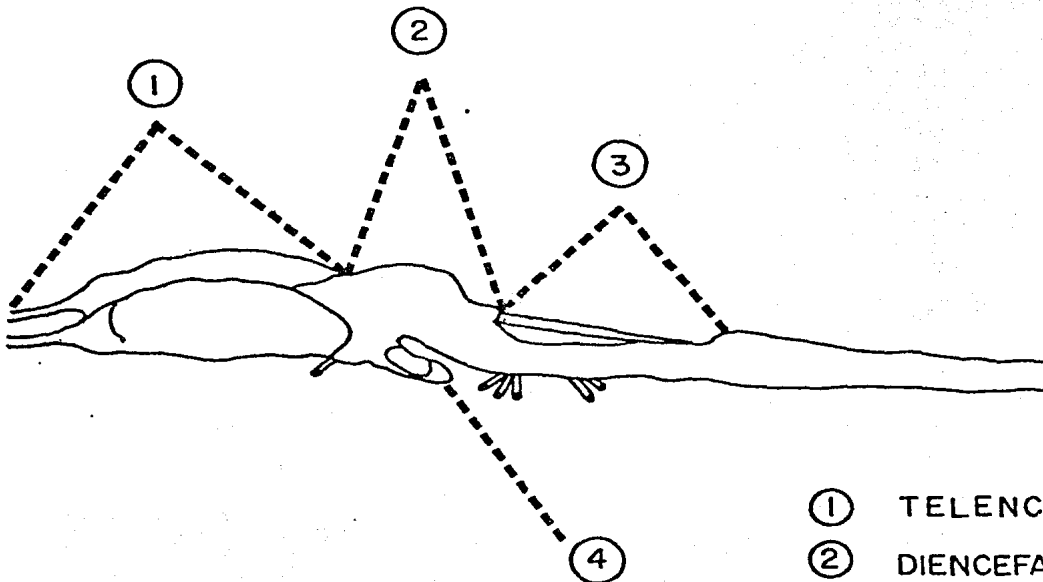
- 1) Telencéfalo (T)
- 2) Diencéfalo-Mesencéfalo (D-M)
- 3) Rombencéfalo (R)
- 4) Hipófisis (H)

Los cortes se hicieron tomando en cuenta el Atlas elaborado para el cerebro de la salamandra (Ambystoma tigrinum por Herrick 1948 (46)). Las regiones separadas fueron las que estructuralmente resultaron distinguibles a un nivel macroscópico; la separación de diencéfalo y mesencéfalo es difícil debido al tamaño tan pequeño y la forma de estas estructuras; por lo cual ambas regiones se trabajaron juntas (esquema 4).

Cada una de las estructuras se colocó por separado sobre hielo seco hasta completar la obtención de las cuatro regiones correspondientes a 20 Ajolotes.

Al término de la disección, cada estructura se pesó en forma individual e incubó en cinco volúmenes de ácido clorhídrico (HCL) 0.1N a 95°C durante 15 minutos (esto se hace con el fin de eliminar la acción de las enzimas que degradan a las encefalinas). Después las muestras se mantuvieron a 4°C durante 5 minutos y se guardaron en el congelador a -20°C para su posterior utilización.

CEREBRO DE AJOLOTE
(Ambystoma mexicanum)



- ① TELECEFALO
- ② DIENCEFALO-MESENFALO
- ③ ROMBENCEFALO
- ④ HIPOFISIS

Esquema 4: Representación esquemática del cerebro del Ajolote (Ambystoma mexicanum), indicando el nivel al cual se hicieron los cortes para obtener las estructuras con las que se trabajó.

Purificación de las encefalinas

- Homogenización. Cada una de las 20 muestras correspondientes a las cuatro regiones, se homogenizó durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm).

- Centrifugación. El homogenado tisular obtenido en el paso anterior fue centrifugado a 20 000 rpm durante una hora a 2°C; recuperándose el sobrenadante.

- Cromatografía de absorción en amberlita XAD-2

La amberlita se lavó previamente a su utilización con diferentes solventes en el siguiente orden: Acetona, Metanol absoluto y agua. Se utilizan tres volúmenes de cada solvente, con tres lavados en cada caso; se deja en cada uno durante 24 horas, quedando finalmente en agua. Estos lavados se hacen con el objeto de liberar a la resina de impurezas y de que sus propiedades cromatográficas se conserven en buen estado.

Se utilizaron columnas de vidrio de 15cm de largo por 0.5cm de diámetro; el nivel de la resina (amberlita) fue de 10 a 11cm.

Una vez preparadas las columnas de amberlita, se reguló la velocidad de flujo a 0.5 ml por minuto y se corrió la muestra haciendo dos lavados a dicha velocidad. El primer lavado fue con 20ml de HCL 0.1N y el segundo con 40ml de agua destilada; finalmente se recuperaron las encefalinas, eluyendo el material retenido por la amberlita, con 20ml de metanol absoluto.

La recuperación de las encefalinas parcialmente

purificadas a partir de extractos tisulares, por este método es de alrededor de un 90% como en (137, 152).

Cuantificación de las encefalinas

Los eluatos obtenidos de la cromatografía de adsorción se evaporaron a sequedad, con aire en baño maría y se rehidrataron con 2 ml de agua destilada. A partir de esta muestra se tomaron las alícuotas para la cuantificación de las encefalinas mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) (85). En el caso de la ME, las muestras fueron previamente oxidadas con 50 microlitros de solución de peróxido de hidrógeno (1.1 ml de H_2O_2 al 30% en 500 ml. de solución) a temperatura ambiente durante 16 horas. La oxidación se hace, debido a que el estandar de ME utilizado para la formación del antisuero para la ME estaba oxidado. Por lo que al oxidar las muestras se mejora el reconocimiento. Después de la oxidación, las muestras se evaporaron y resuspendieron en agua. De éstas se tomaron las alícuotas para la cuantificación del IR-ME. La cuantificación de la IR-LE se efectuó tomando las alícuotas directamente, después de evaporar y rehidratar los eluatos resultantes de la cromatografía de adsorción.

La técnica es específica y de alta sensibilidad. (85). La especificidad está dada por el uso de antisueros; en este caso dirigidos contra las encefalinas y la segunda por el uso de sustancias marcadas radioactivamente. En este trabajo se utilizaron encefalinas marcadas con tritio

(³H-Met-encefalina y ³H-Leu-encefalina) obtenidas comercialmente.

Los antisueros fueron obtenidos previamente en el Laboratorio. Se prepararon mediante la inmunización de conejos Nueva Zelanda con cada uno de los pentapéptidos acoplados a albúmina sérica bovina (BSA) y glutaraldehído, siguiendo el protocolo de inmunización descrito en Vindrola y col. (1981) (152). El anti-Metencefalina presentó un 100% de cruzamiento con (Met (0) encefalina); 0.3% con LE y menos de 0.01% con Met-encefalina-Arg², Leu-encefalina-Arg⁶, Dinorfina 1-13, Alfa, Beta y Gama, endorfina.

El anti-Leu-encefalina presentó un 5.9% de cruzamiento con ME; 1.4% con Dinorfina 1-13 y menos de 0.01% de cruzamiento con Alfa, Beta y Gama endorfina (151).

Los antisueros anti-ME y anti-LE a una dilución final de 1:925 y 1:825 respectivamente se incubaron durante 24 horas con soluciones estándar de encefalina fría (no marcada) en concentraciones crecientes y conocidas, o bien con las alícuotas provenientes del tejido cerebral, en 550 microlitros de Buffer fosfatos 0.1M, pH=7.4 (con 0.9% de NaCl, 0.02% de ácido sódico y 0.1% de gelatina). En ambos casos las muestras se ensayaron por triplicado. Al término de la incubación, la separación de la encefalina marcada unida al antisuero de la no unida, se efectuó con una suspensión de carbón activado (1.5% de carbón activado + 0.15% de nextran en Buffer fosfatos igual al usado en la incubación, pero sin gelatina), mediante centrifugación durante 30 minutos a 3 000 rpm a 2°C, recuperando el sobrenadante, al que se le

agregó líquido de conteo (centelleo) (10ml) (tritón-500 ml, PPO-8g., llevando a dos litros con tolueno).

24 horas después, se contó la radiactividad presente en cada muestra en un contador Beta de centelleo líquido. Las concentraciones tisulares de IR para encefalinas se expresaron en picomoles por gramo de tejido (pmol/g). Los resultados con $n=20$ se estimaron utilizando la prueba de T de Student y se muestran en la tabla IR y 2R.

En la segunda parte de este trabajo para el análisis de la distribución molecular de los péptidos que contienen encefalinas se utilizaron otros 20 Ajolotes, obteniéndose las mismas cuatro regiones que en la primera parte. En este caso se formó una muestra con $n=20$ para cada región. Conforme se obtuvieron las estructuras, fueron pesadas inmediatamente e incubadas a 95°C durante 15 minutos en 5 volúmenes de ácido acético IM pH 1.9 y luego a 4°C durante 5 minutos; congelando para su posterior utilización.

Preparación de los extractos

Cada muestra fue homogenizada a 3000 rpm, durante 5 minutos y centrifugado a 20 000 rpm durante 2 horas a 2°C ; recuperándose el sobrenadante; al cual se le extrajeron los lípidos con tres lavados de n -hexano (30ml cada lavado y centrifugando a 3 000 rpm durante 30 minutos a 2°C).

El extracto, parcialmente libre de grasas se evaporó a sequedad con aire, en baño maría y se reconstituyó con 4ml de ácido acético 1M pH 1.9 con 8M de Urea. La utilización de la Urea se hace con el propósito de desnaturalizar a

las proteínas de los extractos cerebrales; y obtener así la estructura primaria.

Cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-50

Por medio de la cromatografía de filtración en gel se logra la separación de diferentes sustancias, generalmente péptidos y proteínas de acuerdo a su peso molecular. El rango de separación de el Sephadex G-50 es de 30 000 a 1000 Da. (29).

Cada uno de los extractos se paso por una columna de Sephadex G-50 (180cm de largo por 1.5cm de diámetro) previamente caracterizada con diferentes proteínas de pesos moleculares conocidos y equilibrada con el Buffer de elución (ácido acético 1M pH 1.9), a una velocidad de flujo de 3ml por hora, colectando fracciones de 3ml.

Cuantificación de la IR-ME e IR-LE antes y después de la digestión enzimática.

a) RIA antes de la digestión enzimática.

Se tomó una alícuota de cada fracción (20-70). El RIA para cada encefalina fue ensayado por triplicado en dichas fracciones, bajo las mismas condiciones descritas en la primera parte. El RIA de ME se hizo previa oxidación de las alícuotas tomadas de cada fracción. Los resultados se expresaron en picomoles de IR-ME e IR-LE por tubo (fracción). Gráficas IR-8R.

b) Digestión enzimática

La digestión enzimática se hace con el propósito de separar a las encefalinas de los péptidos de mayor peso molecular obtenidos en la cromatografía de Sephadex. Se tomó una alícuota de cada fracción (20-70) y se diluyó 4 veces con el objeto de disminuir la concentración de urea, ya que ésta inhibe la acción enzimática. Las muestras diluidas se evaporaron y resuspendieron en 200 microlitros de buffer tris 50mM + 2mM de CaCl_2 pH 7.9. A cada una se le agregaron 200 microlitros de solución de tripsina TPCK a una concentración final de 50 microgramos/ml, incubando durante 2 horas a 37°C. Al término de este tiempo exactamente se detuvo la acción enzimática aumentando la temperatura hasta 95°C durante 15 minutos. Posteriormente se colocaron a 4°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 3 000 rpm, 5 min. a 2°C. A continuación, se agregó a cada fracción 100 microlitros de solución de carboxipeptidasa B Sigma a una concentración final de 5 microgramos/ml, incubando durante una hora exactamente a 37°C y deteniendo la acción de la enzima de la misma forma que se hizo con la tripsina. Se tomaron diferentes alícuotas de la muestra original para efectuar la digestión enzimática y cuantificar la IR-ME o IR-LE.

c) RIA después de la digestión enzimática.

La IR-LE se midió directamente de las muestras resultantes de la digestión enzimática. En el caso de la IR-ME las muestras fueron oxidadas, como ya se mencionó para los otros casos, y reconstituidas en 500 microlitros de agua des-

tilada, a partir de donde se efectuó la cuantificación bajo las condiciones de RIA ya mencionadas.

Los resultados obtenidos antes y después de la digestión enzimática se expresaron en pmol/tubo y se muestran en las gráficas 1R-8R.

7.0 RESULTADOS

En la tabla IR se presentan los resultados sobre la inmunoreactividad (IR) para las encefalinas (ME y LE) expresada en pmol/estructura y en la tabla 2R. en pmol/g de tejido. En ambos casos los valores representan la media \pm el error estándar para n=20.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, (tabla IR), la cantidad de IR-ME e IR-LE es diferente en cada región. En el telencéfalo (T) se encontró la cantidad más alta de inmunoreactividad para las 2 encefalinas. La hipófisis presenta la menor cantidad de IR-ME y el rombencéfalo, la menor cantidad de IR-LE.

Aparentemente existe una relación proporcional entre la cantidad de IR-ME y el peso de la estructura en el caso del (T) y el Diencéfalo-Mesencéfalo (D-M); que no se presenta en el (R) y la (H). Es decir a mayor peso mayor contenido de IR-EK*. EL (R) pesa más de un 30% que el (D-M) y presenta un contenido de IR-ME menor que (D-M) en un 25%. Mientras que la (H) que pesa alrededor de siete veces menos que (D-M) mostró un contenido de IR-ME equivalente a un tercio de la presente en (D-M) y al 50% del (R).

* Inmunoreactividad a encefalinas

Tabla 1R. Inmunoreactividad (IR) (pmol/estructura) a Metionina-Encefalina (ME) y LeucinaEncefalina (LE) en diferentes estructuras del cerebro de Ajolote (Ambystoma mexicanum)

ESTRUCTURA	Peso estructura (mg)	IR		Proporción ME:LE
		pmol/estructura ME	pmol/estructura LE	
TELENCEFALO	43 \pm 6	74 \pm 12	7 \pm 2	10:1
DIENCEFALO-MESENFALO	14 \pm 1	25 \pm 6	3 \pm 1	8:1
ROMBENCEFALO	23 \pm 3	18 \pm 1	2 \pm 1	9:1
HIPOFISIS	3.2 \pm 0.3	8 \pm 1	3 \pm 1	2.6:1

Los datos representan la media \pm el error estandar con n=20 para cada estructura.

Tabla 2R. Inmunoreactividad (IR) (pmol/g de tejido) a Metionina-Encefalina (ME) y Leucina-Encefalina (LE) en diferentes estructuras del cerebro de Ajolote. (Ambystoma mexicanum)

ESTRUCTURA	Peso estructura (mg)	IR		Proporción ME:LE
		pmol/g ME	de tejido LE	
TELENCEFALO	43 _± 6	1761 _± 75	213 _± 14	8:1
DIENCEFALO-MESENFALO	14 _± 1	1752 _± 64	185 _± 12	9:1
ROMBENCEFALO	23 _± 3	828 _± 64	73 _± 11	11:1
HIPOFISIS	3.2 _± 0.3	2344 _± 101	1074 _± 41	2.2:1

Los datos representan la media \pm el error estandar con n=20 para cada estructura.

Para la IR-LE los resultados son muy semejantes en cuanto a la proporción, respecto al peso de la estructura, sólo que en este caso la mayor cantidad de IR-LE se encontró en (T) y la menor en (R).

Considerando los datos sobre la inmunoreactividad en (pmol/g) (tabla 2R) los valores más altos correspondieron a la (H) y los más bajos a el (R). La IR en pmol/g, al igual que la IR en pmol/g estructura de ME en cada caso, resultó ser alrededor de nueve veces más que la detectada para la IR-LE, excepto en el caso de la (H), donde la IR-LE es casi la mitad de la IR-ME.

La concentración de IR-ME en (T) y (D-M) es casi la misma; alrededor de 1761 ± 75 pmol/g.

En el (R) la concentración de IR-ME (828 ± 64 pmol/g) representa un poco menos de la mitad encontrada en las otras regiones cerebrales. A su vez en la (H) la concentración de IR-ME (2344 ± 101 pmol/g) es 25% más que la presente en el (T) y (D-M) y 36% más que la IR-ME de (R).

Las regiones cerebrales más anteriores (T y D-M) mostraron una concentración muy semejante entre sí de IR-LE, alrededor de 190 pmol/g, siendo menor que en la (H) aproximadamente en un 80% (IR-LE en H es de 1074 ± 41 pmol/g). En el (R) la concentración de IR-LE (73 ± 11 pmol/g) resultó ser menor que en las otras regiones cerebrales en un 60% y que en (H) en un 90%.

La proporción de IR-ME:IR-LE, calculada en base al contenido de IR de cada encefalina en las regiones cerebrales

examinadas (tabla 1R), indican que no hay diferencias grandes en la proporción ME:LE, estando alrededor de 9ME por cada LE. Esta en cada caso, cambia ligeramente, si los cálculos se efectúan en base a los valores de concentración (pmol/g), tabla 2R, sin embargo; la proporción se conserva si se toman en cuenta las desviaciones de los datos.

En las figuras 1R-8R, se muestran los perfiles cromatográficos resultantes de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 de los extractos ácidos para cada una de las cuatro estructuras (muestra con n=20) correspondientes a las dos encefalinas.

Las figuras IR-4R pertenecen a los resultados obtenidos para la IR-ME (pmol/tubo) y las figuras 5R-8R muestran los resultados de la IR-LE (pmol/tubo).

Las mediciones de IR para las dos encefalinas se efectuó a partir de los mismos extractos de cada estructura, considerando todas las fracciones, desde volumen muerto hasta volumen final.

Tanto para la IR-ME como para la IR-LE en las mismas gráficas se incluyen los resultados obtenidos con la digestión secuencial con tripsina y carboxipeptidasa B.

La IR-ME detectada antes de la digestión enzimática, se encontró principalmente en las últimas fracciones, correspondientes al volumen de elución para bajo peso molecular; en la zona donde se eluyó la ME marcada (^3H -Met-encefalina) (como estándar de calibración).

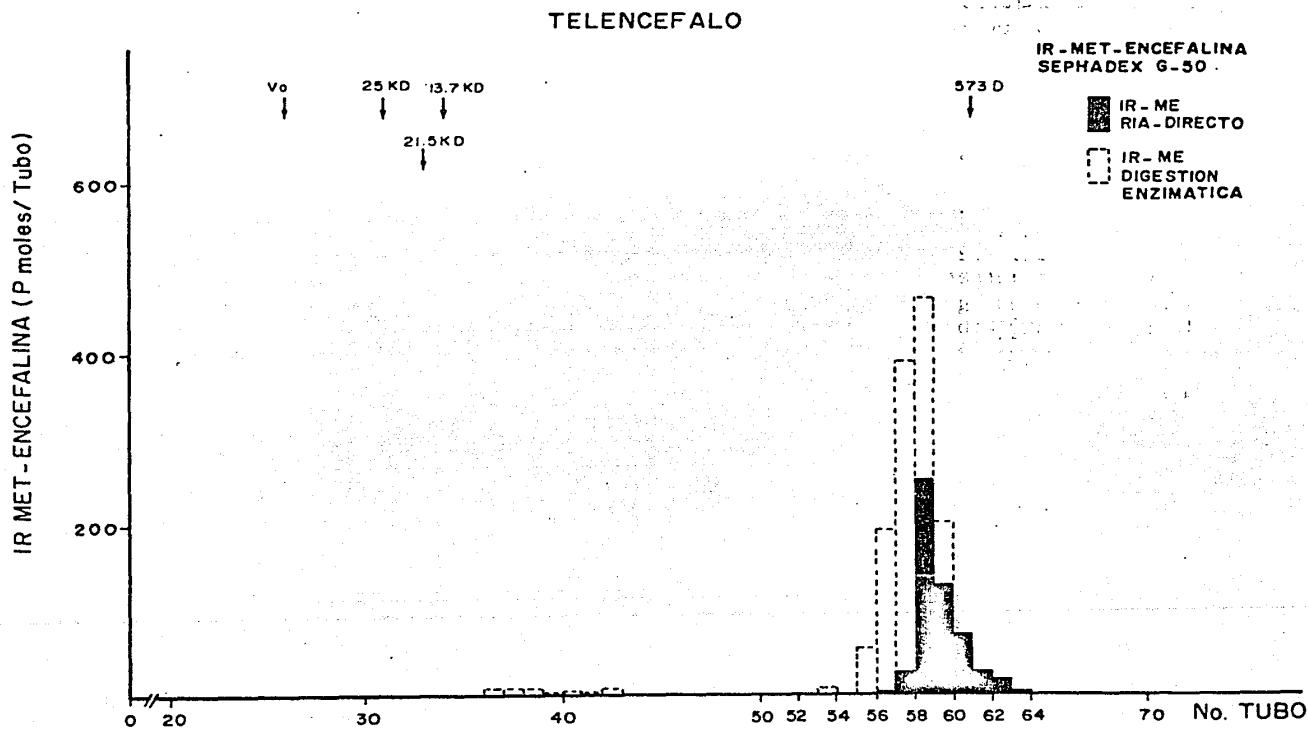


Figura 1R. Inmunoreactividad para Metionina-Encefalina (IR-ME) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de Telencéfalo de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibró previamente con el buffer de elución (ácido acético 1M pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albúmina sérica bovina = 68 KD (Vo), quimiotripsinógeno = 25 KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD y ³H-Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estándares de calibración se eluyó a una velocidad de flujo de 3ml/h, colectando fracciones de 3 ml.

Abreviaciones: KD= Kilodalton, D= Dalton.

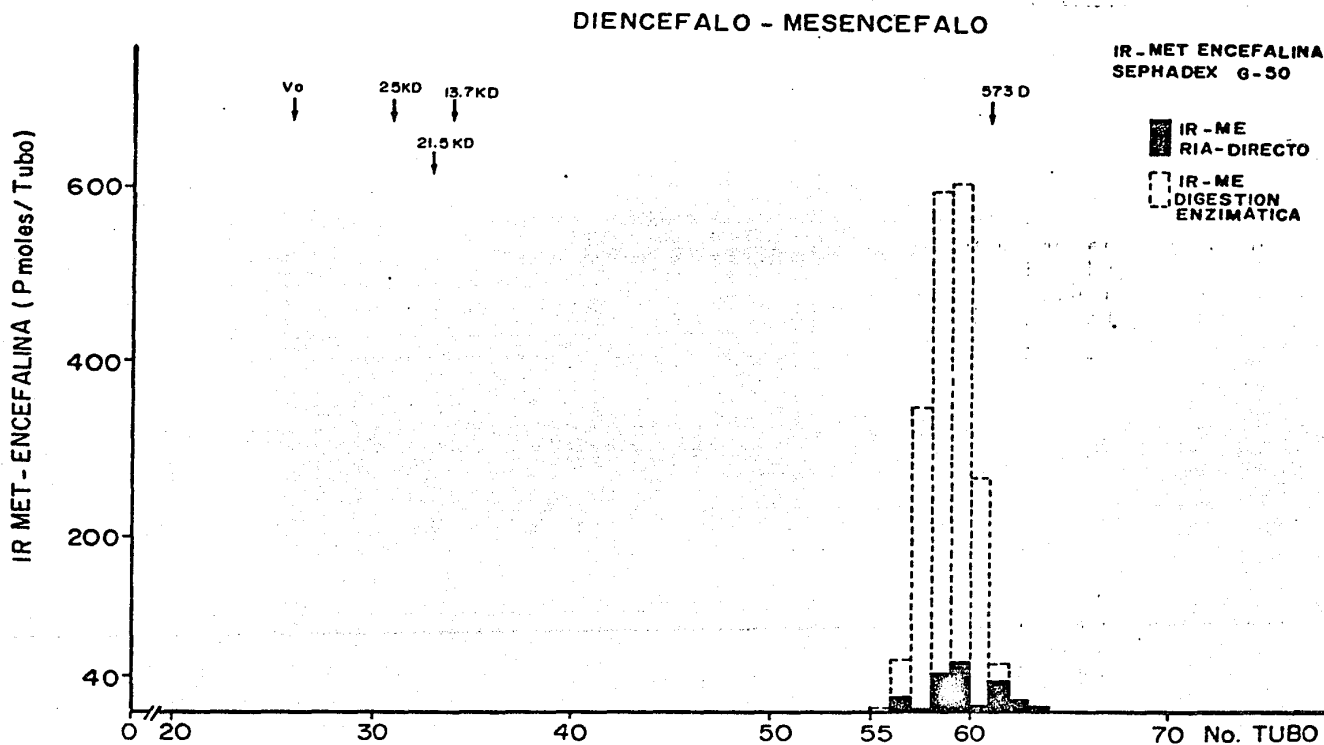


Fig-2

Figura 2R. Inmunoreactividad para Metionina-Encefalina (IR-ME) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de Diencéfalo-Mesencéfalo de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibró previamente con el buffer de elución (ácido acético IM pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albúmina sérica bovina = 68 KD (Vo), quimiotripsinógeno = 25 KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD y ^3H -Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estándares de calibración se eluyó a una velocidad de flujo de 3 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. Abreviaciones: KD = Kilodalton, D = Dalton.

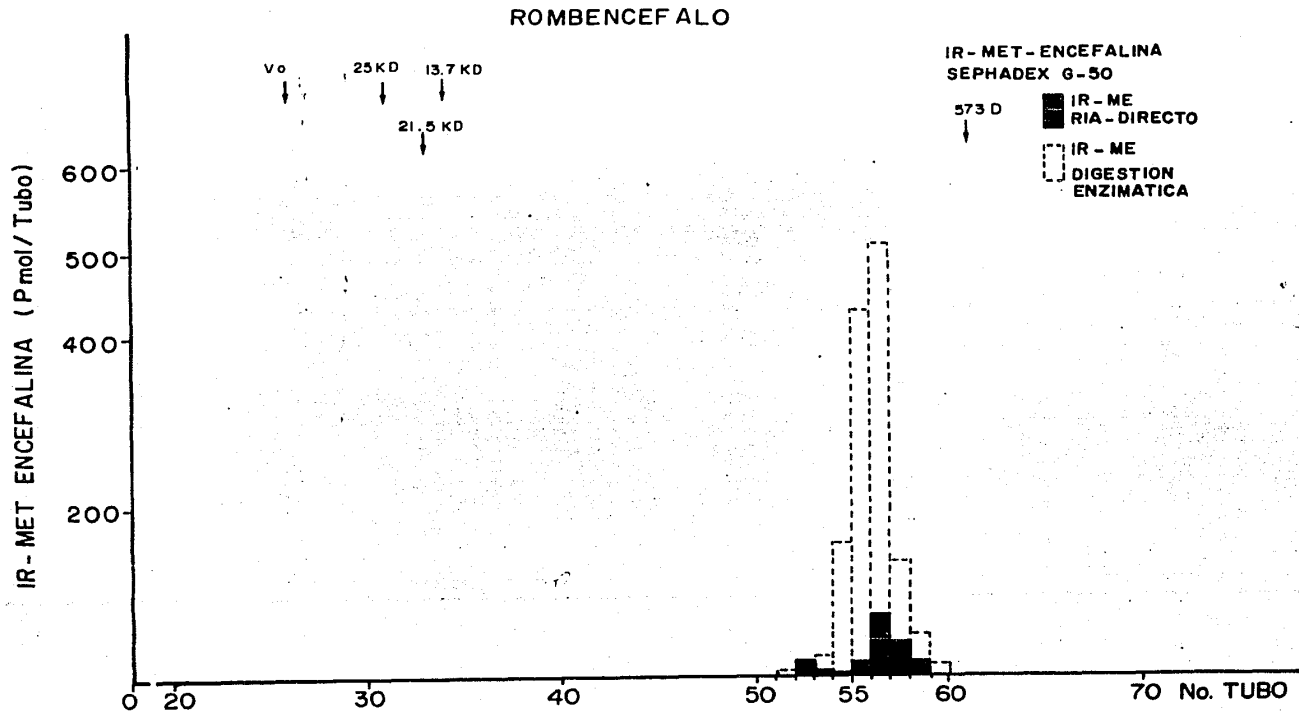


Fig -

Figura 3R. Inmunoreactividad para Metionina-Encefalina (IR-ME) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de Rombencefalo de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibró previamente con el buffer de elución (ácido acético 1M pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albúmina sérica bovina = 68 KD (Vo), quimiotripsinógeno = 25 KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD y ³H-Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estándares de calibración se eluyó a una velocidad de flujo de 3 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. Abreviaciones: KD = Kilodalton, D = Dalton.

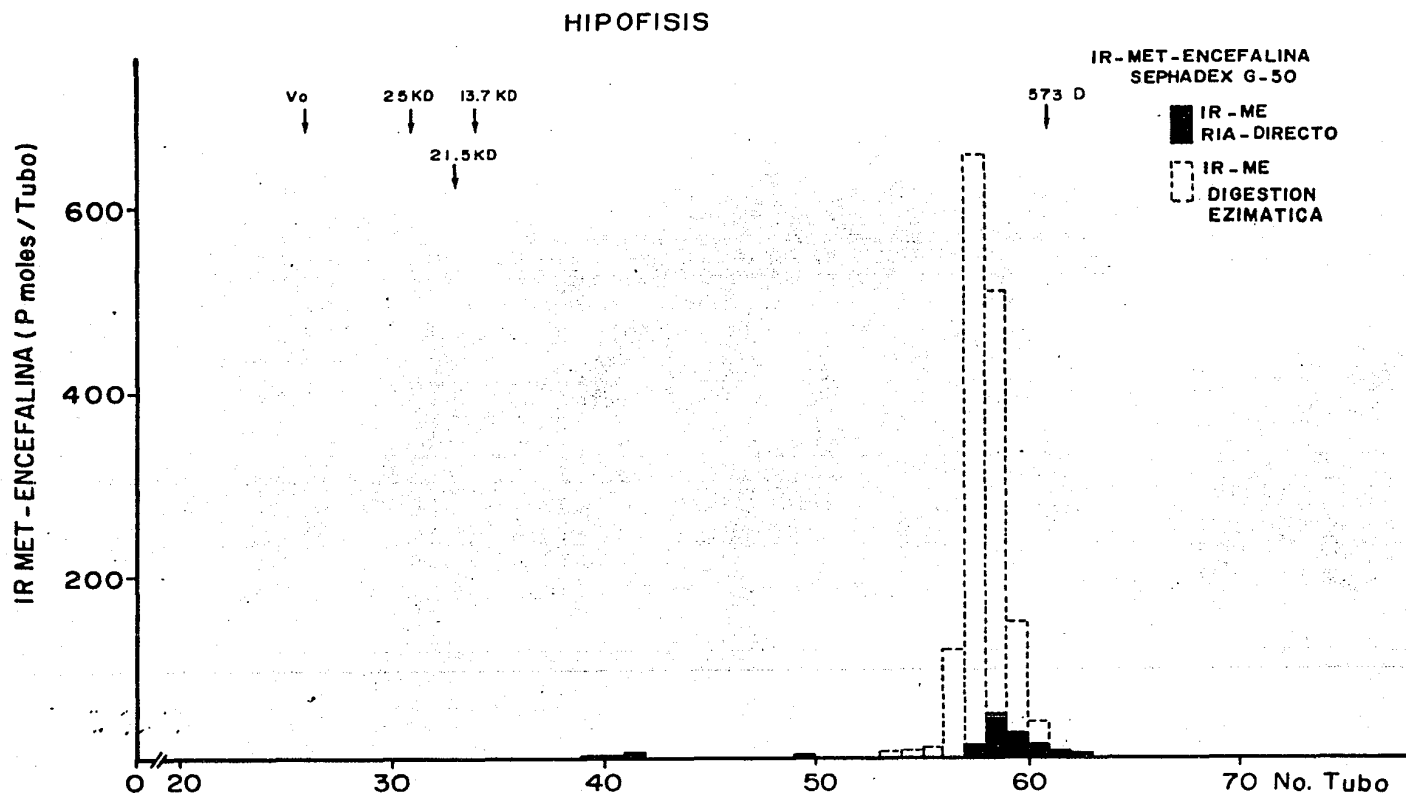


Figura 4R. Inmunoreactividad para Metionina-Encefalina (IR-ME) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de Hipófisis de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibró previamente con el buffer de elución (ácido acético IM pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albumina sérica bovina = 68 KD (Vo), quimiotripsinógeno = 25 KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD y ³H-Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estándares de calibración se eluyó a una velocidad de flujo de 3 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. Abreviaciones: KD = Kilodalton, D = Dalton.

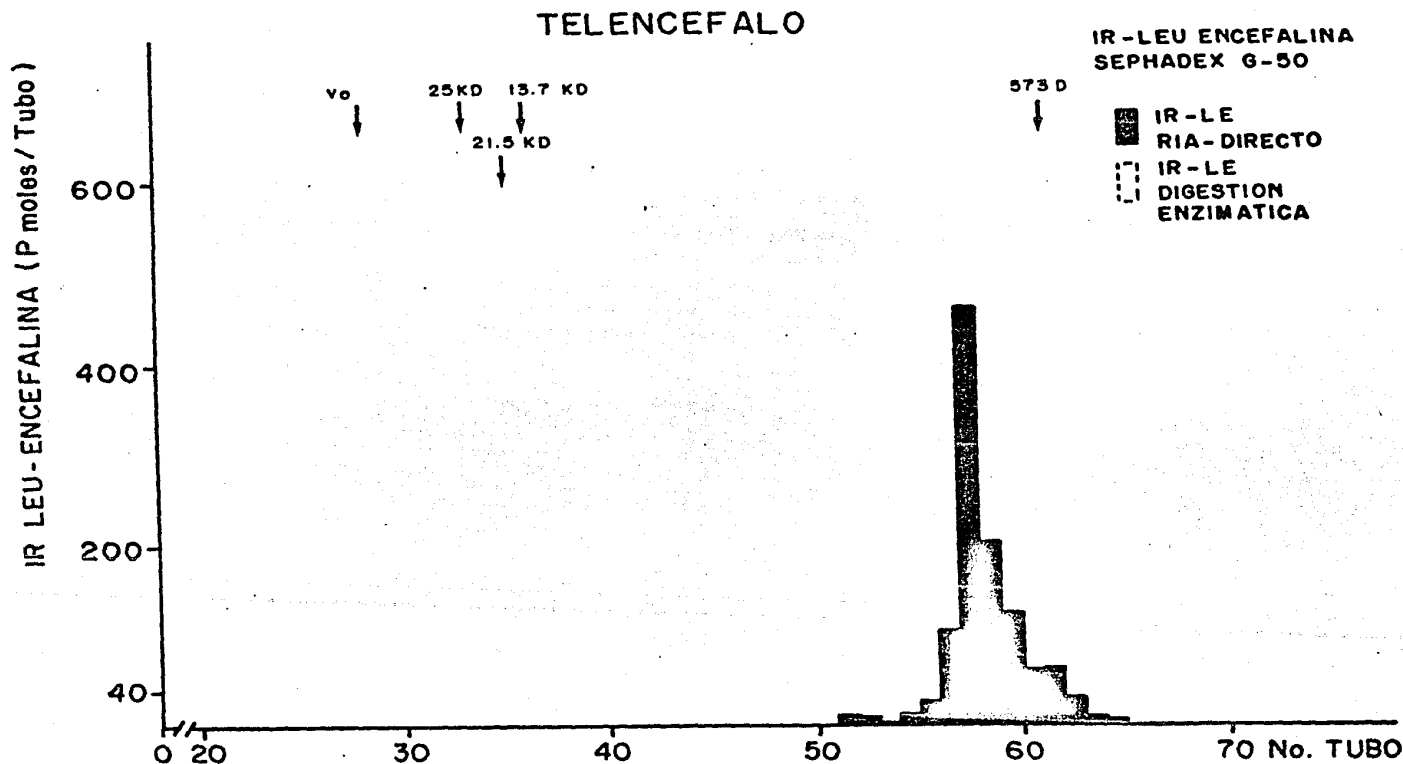


Figura 5R. Inmunoreactividad para Leucina-Encefalina (IR-LE) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de Telencefalo de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibro previamente con el buffer de elución (ácido acético 1M pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albumina sérica bovina = 68 KD (Vo) quimiotipsinógeno = 25KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD y ³H-Met-Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estandares de calibración se eluyo a una velocidad de flujo de 3 ml/h, coléctando fracciones de 3 ml. Abreviaciones: KD = kilodalton, D = dalton.

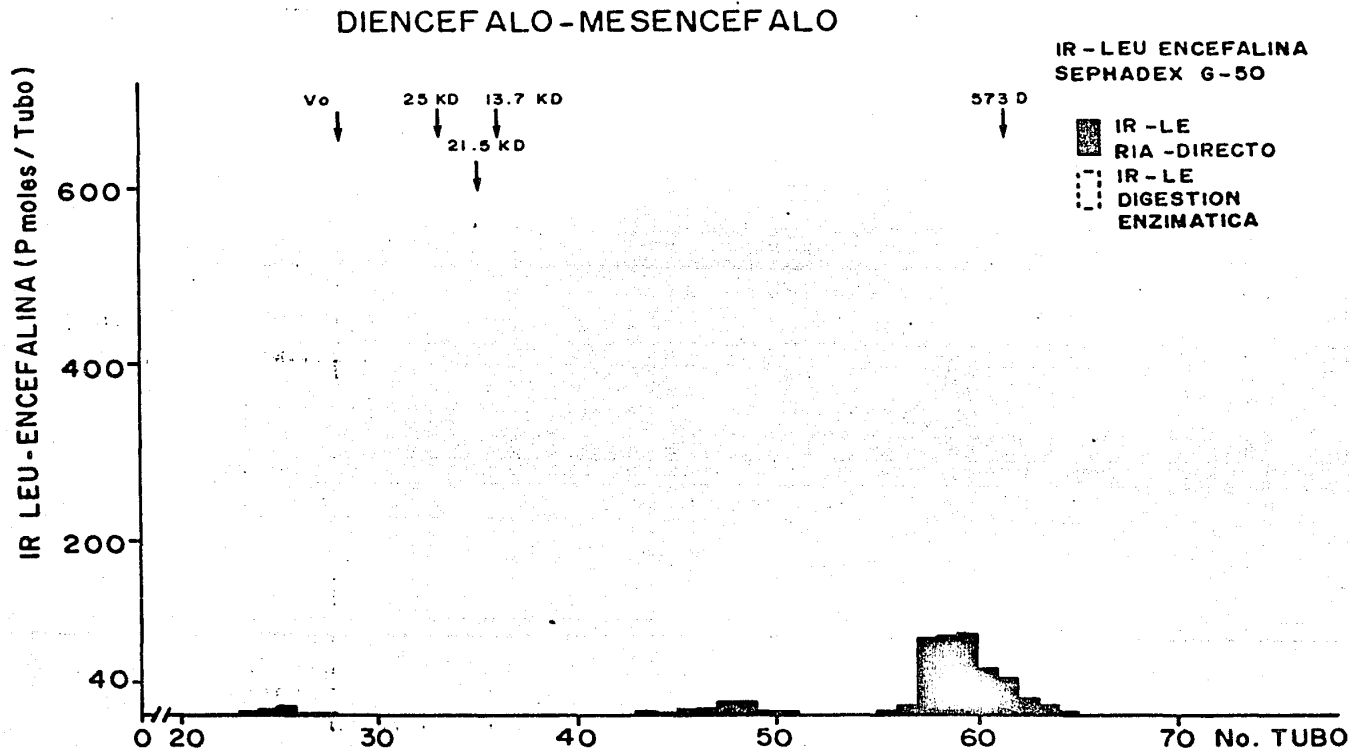


Fig - 6

Figura 6R. Inmunoreactividad para Leucina-Encefalina (IR-LE) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de Diencefalo-Mesencefalo de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibró previamente con el buffer de elución (ácido acético IM pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albúmina sérica bovina = 68 KD (Vo), quimiotripsinógeno = 25 KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD y ³H-Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estándares de calibración se eluyó a una velocidad de flujo de 3 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. Abreviaciones: KD = Kilodalton, D = Dalton.

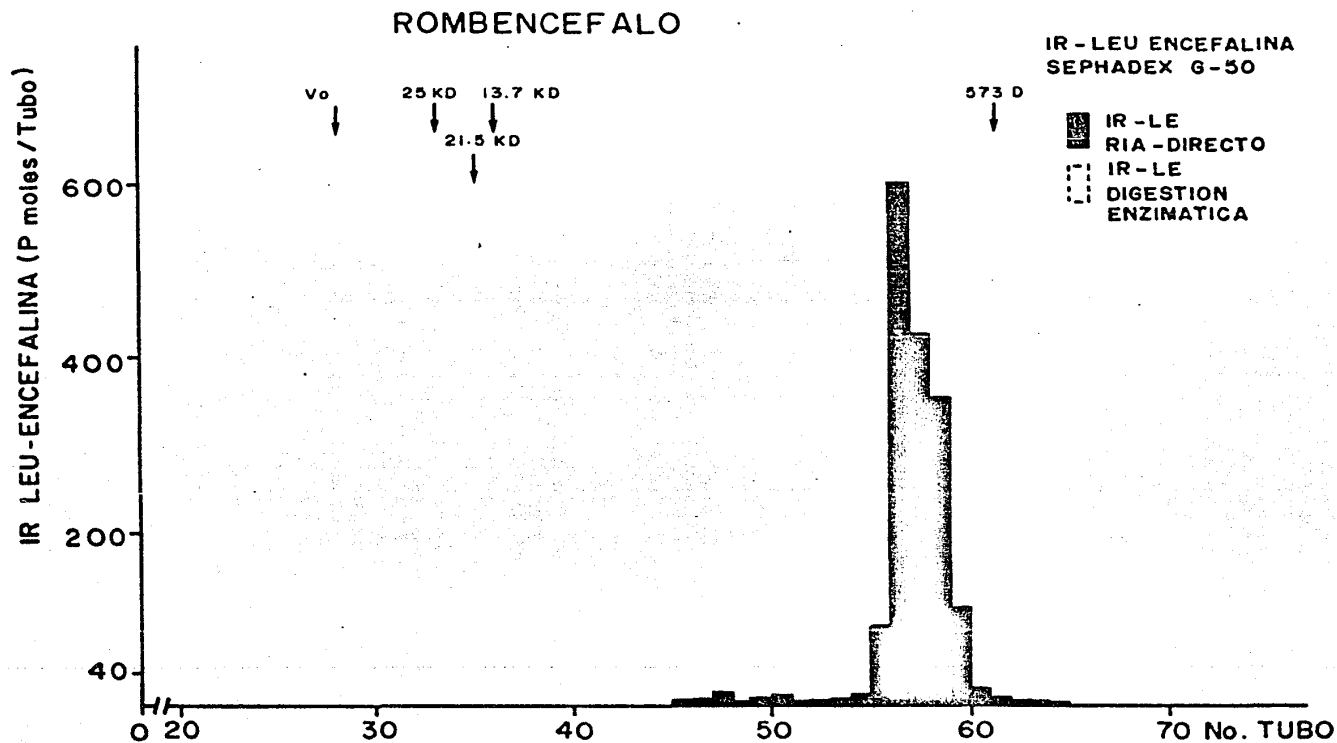


Fig- 7

Figura 7R. Inmunoreactividad para Leucina-Encefalina (IR-LE) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de Rombecephalo de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibró previamente con el buffer de elución (ácido acético IM pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albúmina sérica bovina= 68 KD (Vo), quimiotripsinógeno = 25 KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD, ³H-Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estándares de calibración se eluyó a una velocidad de flujo de 3 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. Abreviaciones: KD = Kilodalton, D = Dalton.

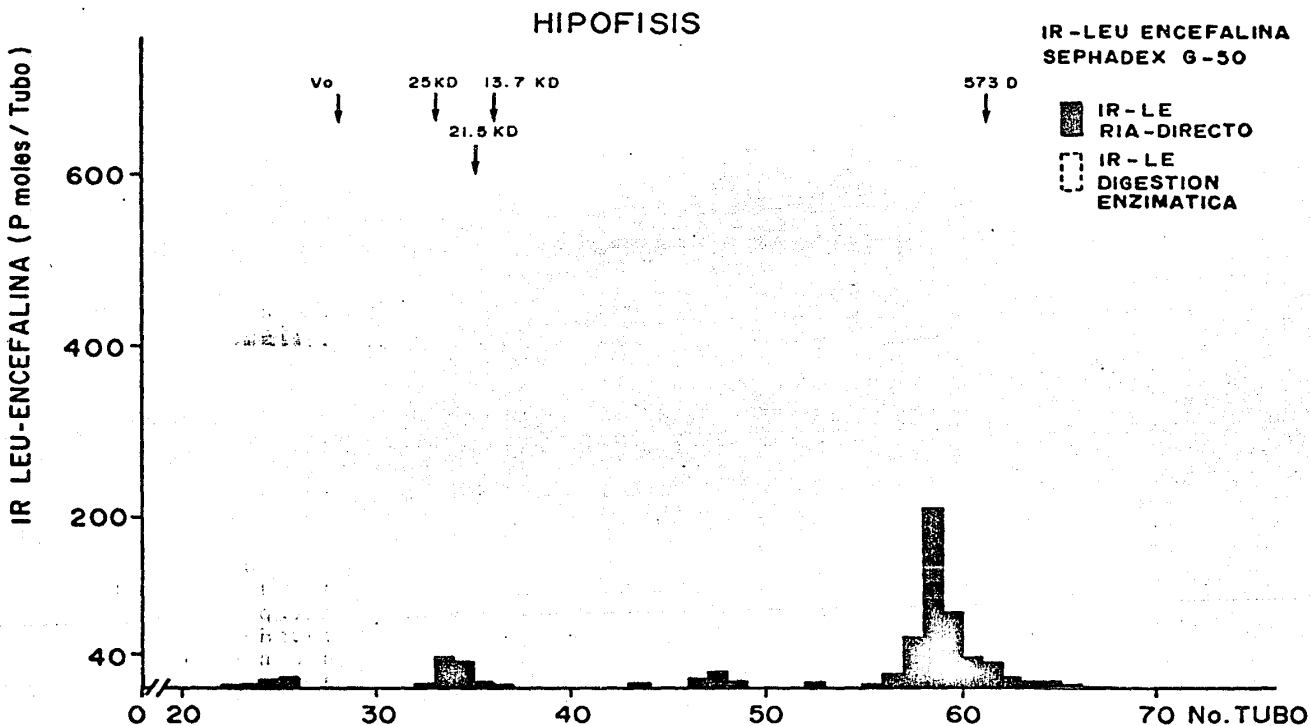


Figura 8R. Inmunoreactividad para Leucina-Encefalina (IR-LE) resultante de la cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos Hipófisis de Ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (n=20) antes y después de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La columna (80 x 1.5 cm) se equilibró previamente con el buffer de elución (ácido acético IM pH 1.9). La calibración en cuanto a pesos moleculares se hizo con: albúmina sérica bovina = 68 KD₃ (Vo), quimiotripsinógeno = 25 KD, inhibidor de tripsina = 21.5 KD, ribonucleasa A = 13.7 KD y ³H-Met-Encefalina = 573 D. La muestra problema al igual que los estándares de calibración se eluyó a una velocidad de flujo de 3 ml/h, colectando fracciones de 3 ml. Abreviaciones: KD = Kilodalton, D = Dalton.

En esta misma zona fue donde la IR-ME fue incrementada como resultado del tratamiento enzimático. En todos los casos el incremento de IR-ME, después de la digestión enzimática fue mayor al 50%.

Al igual que para el caso de la IR-ME, la IR-LE antes de la digestión enzimática se localizó en las últimas fracciones (tubos), pero a diferencia de lo que sucede en el caso de la IR-ME, en este caso la digestión secuencial con tripsina y carboxipeptidasa B ocasionó la desaparición completa de la IR-LE.

Una observación importante es que la cantidad total de IR-LE esperada en la segunda parte de este trabajo, se contradice hasta cierto punto con lo encontrado en la primera parte, La cantidad total de IR-LE en la cromatografía de filtración en gel resultó ser mucho mayor que la esperada, de acuerdo a los resultados para IR-LE obtenidos al efectuar la medición de la IR-ME a partir de los eluatos obtenidos por medio de cromatografía de absorción en amberlita XAD-2.

8.0 DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la presencia de las encefalinas en el cerebro y la hipófisis del Ajolote (Ambystoma mexicanum) en concentraciones relativamente altas.

Comparando la concentración detectada en el cerebro total de rata (320 pmol/g) (87) con lo encontrado en el

Ajolote, se tiene que en la hipófisis la concentración de IR-ME es casi siete veces más; en las regiones media y anterior del cerebro (T y D-M) es alrededor de cinco veces más y en el rombencéfalo un 30% más que en el cerebro total de rata (tabla 2R)

Respecto a la IR-LE sucede algo semejante; con la mayor concentración en la H, la cual resultó ser casi 18 veces más que la IR-LE de cerebro total de rata (87).

Las altas concentraciones de encefalinas detectadas en el cerebro y la hipófisis del Ajolote concuerdan con lo encontrado para reptiles (87) y con la observación de Simantov (1976) (133) en cuanto a que en las especies submamíferas la concentración de encefalinas es notablemente mayor que en mamíferos.

La discrepancia podría explicarse tomando en cuenta las diferencias en cuanto al desarrollo de la corteza cerebral de los vertebrados. Se podría asumir que las concentraciones altas de encefalinas en las especies submamíferas, se relaciona con las cantidades relativas de encefalinas en varias regiones del cerebro; se ha visto que en general la concentración de encefalinas en la corteza cerebral de mamíferos son bajas (63, 152) y se ha propuesto que quizás la diferenciación extensiva y el crecimiento de la corteza cerebral en los mamíferos ocasiona una dilución en las concentraciones subcorticales de las encefalinas; así que en el cerebro total de mamíferos tienden a ser menores. Por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo podrían

reflejar la carencia relativa de tejido cortical en los anfibios.

Tratando de abordar la posibilidad del origen biosintético de las encefalinas, consideremos la proporción IR-ME: IR-LE en cada una de las regiones.

En el caso del encéfalo de Ajolote hemos encontrado que la proporción IR-ME: IR-LE se conserva en las tres regiones examinadas, alrededor de 9ME: 1LE; proporciones que no concuerdan con lo encontrado en mamíferos, donde se acepta de manera general que las encefalinas se generan a partir de la PEF, encontrándose una proporción de 4ME: 1LE. En base a esto se podría suponer que en el cerebro del Ajolote las encefalinas se generan de manera diferente que en el cerebro de los mamíferos. Esta diferencia podría ser a nivel de la estructura del precursor o bien a nivel del procesamiento postraducciona1.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo encontrado en otro anfibio; el sapo Buffo marinus, en que la concentración de IR-ME es mucho mayor que la de IR-LE (65). Sin embargo; la proporción IR-ME: IR-LE que se detectó en el sapo no coincide con lo encontrado para el Ajolote; ya que en el sapo hay 25 veces más IR-ME que IR-LE; mientras que nuestros resultados indican una proporción de 9ME por cada LE.

Esta diferencia entre el sapo y el Ajolote podría explicarse considerando que se trata de especies diferentes, como ocurre en el caso de especies distintas de reptiles,

pertenecientes a órdenes diferentes. En éstos, las concentraciones de encefalinas y las proporciones de éstas varían dependiendo de la especie, con la mayor concentración en la tortuga y la menor en lagartija (87). O bien a que en el caso del sapo se trabajó con cerebro total, mientras que en el Ajolote se seccionó al cerebro; esto sería suponiendo que las encefalinas se generan de la misma forma entre estos dos anfibios.

Por otro lado suponiendo que en anfibios, incluyendo al Ajolote, existiera la PEF y que ésta fuera igual a la detectada en los mamíferos en cuanto al contenido de ME y LE, en base a las proporciones de estos dos pentapéptidos, se podría pensar que las diferencias en la proporción ME: LE entre anfibios y mamíferos se deben a diferencias en el procesamiento postraducciona del precursor. No obstante; la secuencia nucleótida de la PEF de la rana Xenopus laevis indica que la secuencia de la LE no está presente en la PEF de este anfibio (94). Asumiendo que es más factible un parecido entre anfibios que entre anfibios y mamíferos, cabría esperar que en el Ajolote, la ME se podría generar a partir de un precursor muy semejante a la PEF detectada en Xenopus laevis. Esto podría explicar cuál es la fuente de origen de la ME pero no de la LE, lo cual hace sugerir que ésta puede originarse a partir de un precursor diferente.

En mamíferos se ha propuesto que la LE puede derivarse de los dos precursores que la contienen, la PEF y la PDNF (132, 157, 162). La presencia del sistema de la PDNF

ha sido evidenciada en el SNC de anfibio, el sapo Buffo marinus y por tanto sería factible que en el Ajolote también existiera este sistema, a partir del cual se podrá generar la LE que se ha detectado en su cerebro.

La existencia de los tres sistemas de péptidos opioides en el SNC de los anfibios ha sido demostrada (16, 65, 77, 78, 93, 94, 150, 155). Aunque para el orden de los Urodelos sólo se ha reportado un trabajo sobre la presencia de las encefalinas en las células amácrinas de la retina de la salamandra (155), tomando en cuenta la presencia de los tres sistemas de péptidos opioides en el orden de los Anuros se sugiere que en los Urodelos y por tanto en el Ajolote, también exista el sistema de la PEF, PDNF y de la POMC.

Los resultados obtenidos en este trabajo por sí solos no pueden aportar evidencias suficientes respecto a esta posición, por lo cual sería necesario efectuar otros trabajos más detallados y encaminados a demostrar o descartar tal posibilidad, como por ejemplo para evidenciar la presencia de la PDNF en el SNC del Ajolote y discernir si a partir de ésta se genera la LE.

Independientemente del precursor principal (PEF o PDNF) del que provengan las encefalinas en el SNC del Ambystoma mexicanun, los resultados de la cromatografía de filtración molecular indican que en su generación no participen intermediarios estables de alto peso molecular y éstas se encuentran principalmente en forma libre. En el caso de la ME podrían existir precursores de bajo peso molecular en las cuatro estructuras examinadas, ya que como resultado de

la digestión con tripsina y carboxipeptidasa B para las fracciones de la cromatografía en Sephadex se observó un incremento de IR-ME respecto a la IR-ME obtenida para las mismas fracciones antes de la digestión enzimática, en un volumen de elución correspondiente a bajo peso molecular, muy cercano al volumen de elución para 573D (Figura 1R-4R).

Respecto a la LE, después de la digestión enzimática, la IR-LE desapareció completamente, lo cual podría deberse a la dilución de las muestras para disminuir la concentración de la urea, ocasionando que mediante nuestro método no se detectara nada. Además esto hace suponer que la LE se encontraba en una forma libre, ya que si hubiera estado incluida en intermediarios; con el efecto de la digestión enzimática su concentración habría aumentado como en el caso de la ME. Otra posibilidad es que aunque su concentración no hubiera disminuido mucho por la dilución, debido a que se encontraba en forma libre; la acción de las enzimas utilizadas en el ensayo haya ocasionado alguna modificación e inclusive las haya digerido. Apesar de que no son el sustrato específico (aminoácidos básicos), si tal sustrato específico no existe, las enzimas también podrían romper a nivel de otros aminoácidos durante el tiempo de incubación utilizado.

En conclusión, los resultados de este trabajo indican:

- a) La existencia de IR para las dos encefalinas en las cuatro estructuras examinadas del SNC del Ambystoma mexicanum

- b) Una diferencia regional en cuanto a la concentración de la IR para encefalinas, con la mayor concentración en la hipófisis y la menor en rombencéfalo (tabla 2R).
- c) Que la proporción IR-ME: IR-LE está alrededor de 9ME: 1LE, excepto para la hipófisis, que es de 2ME: 1LE; diferencia debida a la alta concentración de IR-LE en la hipófisis. Las proporciones que se encuentran en el Ambystoma mexicanum son diferentes a las reportadas para tejidos de mamíferos en los que se asume que ambas encefalinas se generan a partir de la PEF y se encuentran en una proporción de 4ME: 1LE esto aunado a la ausencia de LE en la PEF del anfibio Xenopus laevis y la presencia de IR para péptidos derivados de la PDNF en el SNC del sapo Buffo marinus hace sugerir que en el SNC de Ambystoma mexicanum existe una PEF que no contiene LE y que muy probablemente también existe la PDNF, por lo tanto se plantea que la IR-LE en Ambystoma mexicanum podría provenir de la PDNF.

Por otro lado, la diferencia en la proporción de IR-ME: IR-LE entre la hipófisis (2ME; 1LE) y las otras tres estructuras examinadas tal vez podría tener un significado fisiológico si se considera la importancia de la hipófisis como principal glándula de secreción interna en los vertebrados. Cabría esperar que las encefalinas estuvieran involucradas en las funciones endócrinas del Ambystoma mexicanum. La participación de la LE podría ser más significativa, ya que en la hipófisis se encontró

la mayor concentración de IR-LE, lo cual aunado a la presencia del sistema de la PDNF en el SNC de Buffo marinus que presenta la mayor concentración de IR-Din 1-13 precisamente en la hipófisis podría estar relacionado con la posibilidad de que la LE provenga de la PDNF en los anfibios.

- d) Que el procesamiento del precursor principal hacia las encefalinas no incluye intermediarios de alto peso molecular; sino que más bien es directo hacia encefalinas libres y péptidos de bajo peso molecular que contienen ME. Los precursores inmediatos de ME podrían ser péptidos de un peso molecular muy cercano al de la ME. Según nuestros resultados la concentración de tales precursores varía entre las estructuras, la cantidad de IR-ME con la digestión enzimática en relación a la IR-ME libre en cada caso fue diferente, con la mayor cantidad en la hipófisis y la menor en el telencéfalo.

En el caso de la LE inclusive, se podría pensar que en su generación no intervienen ni péptidos de bajo peso molecular. Sin embargo en este caso hace falta aclarar algunos aspectos contradictorios en relación a los resultados obtenidos. La cantidad de IR-LE antes de la digestión enzimática fue mayor a la esperada en base a la cantidad correspondiente a la primera parte de este trabajo. Esto ocasionó que la proporción de IR-ME: IR-LE libre en los perfiles cromatográficos de Sephadex G-50 fuera diferente a la observada a partir de la cro-

matografía de adsorción en amberlita XAD-2. Esta contradicción podría explicarse suponiendo que con el procesamiento para la obtención de los extractos, la LE se separó de su precursor principal aumentándose así la LE libre, lo cual también podría relacionarse con la desaparición de la IR-LE después de la digestión enzimática. Para aclarar por lo menos en parte esta contradicción habría que incluir controles más rigurosos en el método, sobre todo en cuanto a la recuperación en cada paso y antes de pasar el extracto por la columna de Sephadex o tal vez hasta cambiar la metodología de extracción para la LE, así como los tiempos de incubación y concentraciones de la enzimas. La optimización de estos aspectos metodológicos requiere del diseño y desarrollo de otros experimentos que por el momento quedan fuera del alcance de esta tesis.

En este trabajo se han aportado evidencias que plantean la posibilidad de que cada una de las encefalinas provenga de un precursor diferente aspecto que habría que demostrar y en caso de ser así; el SNC del Ajolote Ambystoma mexicanum ofrece un buen modelo para el estudio bioquímico de cada encefalina por separado. En este sistema es probable que se pueda discernir su participación por separado en procesos fisiológicos. Además de que representaría una evidencia clara de que la LE se genera a partir de la PDNF, aspecto que se ha propuesto para mamíferos, pero que, debido a la doble posibilidad de origen para la LE (de PEF o PDNF)

en tejidos donde ambos sistemas coexisten no ha sido posible esclarecer.

Por otro lado, los datos obtenidos en este tipo de estudios, si bien por el momento, no pueden aportar información sobre el significado fisiológico de las encefalinas en los anfibios; son información complementaria sobre la existencia de los péptidos opioides en el SNC de los vertebrados, en este caso particular de un anfibio Urodela; información que puede servir para conocer la distribución filogenética de los péptidos opioides; y tal vez ubicar su significado evolutivo.

BIBLIOGRAFIA

1. AKIL H, MAYER D and LIEBESKIND J (1976). Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* 191:961-962.
- 1'. ALBERT, BRUCE et al. "Molecular Biology of the cell", Cap 13. Pag: 717-729. Gorland Publishing. Inc, New York. 1983.
2. AKIL H, SHIOMI H, THOMPSON R, LAX S, COY D and WATSON S. (1982). The signal peptide of pro-opiomelanocortin: Validation of a specific radioimmunoassay. *Life Sci.* 31:2271-2273.
3. ALUMETS J, HAKANSON R, SUNDLER F and THORELL J (1979). Neuronal localization of immunoreactive enkephalin and beta-encorphin in the earthworm. *Nature* 279:805-806.
4. BAYON A, KODA L, BATTENBERG E, AZAR R and BLOOM F (1980) Regional distribution of endorphin, met-enkephalin and leu-enkephalin in the pigeon brain. *Neurosc. Lett.* 16:75-80.
5. BEAUMONT A, FUENTES J, HUGHES J and NETTERS K (1980). Opioid peptide precursors in striatum. *Febs Lett.* 122:135-137.
6. BENNET H, BROWNE C and SOLOMON S (1981). Biosynthesis of phosphorylated formas of corticotropin-related peptides. *Proc Natla Acad Sci Usa.* 78:4713-4717.
7. BISSETE G, NEMEROFF B and MACKAY V (1986). Neuropeptides and schizophrenia. *Progress in Brain Resesrch* 66:161-173.
8. BLOOM F, BATTENBURG E, ROSSIER J, LING N and GUILLEMIN R (1978). Neurons containing beta-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75: 1591-1595.
9. BRAUTH S (1984). Enkaphalin-like Immunoreactivity within the Telencephalon of the reptile Caiman crocodilus. *Neuroscience* 11 (2):345-358.

10. BROWNSTEIN J, RUSSEL T and GAINER H (1980). Synthesis, Transport and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207:373-378.
11. BUATTI M and PASTERNAK G (1981). Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. *Brain Research* 218: 400-405.
12. CIVELLI O, BIRNBERG N and HERBERT E (1982). Detection and quantitation of Pro-opiomelanocortin mRNA from different Species. *J. Biol. Chem.* 257:6783-6787.
13. COMB M, SEEBURG P, ADELMAN J, EIDEN L and HEBERT E (1982). Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295:663-665.
14. CHANG W-L, GAINER H, RUSSELL J and Loh Y (1982). Proopiomelanocortin-converting enzyme activity in bovine neurosecretory granules. *Endocrinology* 111: 1607-1614.
15. CHEN C, DIONNET T and ROBERTS L (1983). Regulation of the proopiomelanocortin mRNA levels in rat pituitary by dopaminergic compounds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 2211-2215.
16. CONE R and GOLDSTEIN A (1982). A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79:3345-3349.
17. DANDEKAR S and SABOL S (1982). Cell free translation and partial characterization of proenkephalin mRNA from bovine striatum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 67-74.
18. DANDEKAR S and SABOL S (1982). Cell free translation and partial characterization of mRNA coding for enkephalin-precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79: 1017-1021.
19. DE LA BAUME S, SCHWARTZ J, CHAILLET P, MARCOIS-COLLADO H and CONSTENTIN J (1983). Participation of both "enkephalinase" and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Neuroscience* 8: 143-151.

20. DORES R (1983). Further characterization of the mayor forms of reptile Beta-Endorphin. Peptides 4:897-905.
21. DORES R, AKIL H and WATSON S (1984). Strategies for studying opioid peptide regulation of the gene message and protein levels. Peptides 5: suppl (1):9-17.
22. DORES R, KHACHATURIAN H, WATSON S and AKIL H (1984). Localization of neurons containing pro-opiomelanocortin related peptides in the hypothalamus and midbrain of lizard, Anolis carolinensis: evidence for region-specific processing of Beta-endorphin. Brain Res. 324: 384-389.
23. DOUGLASS J, CIVELLI O, BIRNBERG N, COMB M, Uhler M, LISSITZKY J-C and HERBERT E (1984). Regulation of expression of opioid peptide genes. Ann Neurol. 16 (suppl): 522-530.
24. Ducibela T (1974a). Occurrence of biochemical metamorphic events without anatomical metamorphosis in the axolotl. Dev. Biol. 38:175-186.
25. DUCIBELLA T (1974b). The influence of L-thyroxine on the change in red blood cell type in the axolotl. Dev. Biol. 38:187-194.
26. EIPPER B and MAINS R (1980). Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin endorphin and related peptides. Endocrinol Rev. 1:1-27.
27. ESTIVARIZ E and ITURRIZA C (1985). An investigation on processed peptides from the teleost fish. Prochilodus platensis. Peptides 6:817-824.
28. EVANS S and ROFMAN A (1982). Plantas de los dioses. pag: 20-21. Fondo de Cultura Económica. México.
29. FISHER L (1975). Introducción a la cromatografía en gel. Ed. El Manual Moderno. pp: 195.

30. FISCHLI W, GOLDSTEIN A, HUNKAPILLER M and HOOD L (1982). Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000 dalton dynorphin from porcine pituitary. Proc Natl Acad Sci USA 79: 5435-5437.
31. FLEMINGER G, EZNA E, KILPATRICK D and UDENFRIEND S. (1983). Processing of enkephalin-containing peptides in isolated bovine adrenal chromaffin granules. Proc Natl Acad Sci. USA. 80:6418-6421.
32. FRENK H, CORTHY B and LIEBESKIND C (1978). Different brain areas mediate the analgesic and epileptic properties of enkephalin Science 200: 335-336.
33. FRICKER L and SNYDER (1983). Purification and characterization of enkephalin-convertase an enkephalin-synthesizing carboxipeptidase. J. Biol. Chem. 258: 10950-10955.
34. GAINER H, SARNE Y and BROWNSTEIN J (1977). Biosynthesis and axonal transport of rat neurohipophysial proteins and peptides. J. Cell. Biol. 73: 366-381.
35. GEORGE D and DUBOIS M (1984). Methionine-enkephalin-like immunoreactivity in the nervous ganglion and the ovary of a protochordate, Ciana intestinalis. Cell. Tissue Res. 236: 165-170.
36. Glembotski C (1981). Subcellular fractionation of pro-adrenocorticotrophic hormone/endorphin in rat intermediate pituitary. J. Biol. Chem. 257:10493-10500.
37. GOLDSTEIN A, FISCHLI W, LOWENEY L, HUNKAPILLER N and HOOD L (1981). Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. Proc Natl Acad Sci USA. 78:7219-7223.
38. GOLDSTEIN A, LOWENEY I and PAL K (1971). Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener, levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA. 68 (8): 1742-1747.

39. GRAF L, KENESSEY A, PATTY A, GRYNBAUM A, MARKS N and Lajtha A (1979). Cathepsin D generates gamma endorphin from betaendorphin. Arch Biochem Biophys. 193:101-109.
40. GUBLER U, SEEBURG P, HOFFMAN J, Gage P and Udenfriend S (1982). Molecular cloning establishes pro-enkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. Nature 295:206-208.
41. HABENER J and POTTS T Jr (1979). Subcellular distributions of parathyroid hormone, hormonal precursors, and parathyroid secretory protein. Endocrinology 104: 265-275.
42. HENDERSON G, HUGHES J and KOSTERLITZ H (1972). A new example of a morphine sensitive neuro-effector junction: adrenergic transmission in the mouse vas deferens. B.J. Pharmacol. 46: 764-767.
43. HENDERSON G, HUGHES J and KOSTERLITZ H (1978). In vitro release of Leu- and Met-enkephalin from the corpus striatum. Nature 271:677-676.
44. HERBERT E, BUDARF M, PHILLIPS M, ROSA P, POLICASTRO P, OATES E, ROBERTS L, SEIDAN G and CHRÉRETIEN M (1980). Presence of a pre-sequence (signal sequence) in the common precursor to ACTH and endorphin and the role of glycosylation in processing of the precursor and secretion of ACTH and endorphin. Ann. N.Y. Acad Sci. 343: 79-93.
45. HERBERT E, CIVELLI O, DOUGLAS J, MARTENS G and ROSEN H (1985). Generation of diversity of opioid peptides. Biochem Actions of Hormones. Vol XII. Cap 1. pp 2-35.
46. HERRICK J (1948). The brain of the Tiger Salamander. Ambystoma tigrinum The University of Chicago Press.
47. HOLLT V (1986). Opioid peptide processing and receptor selectivity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26:59-77.

48. HUGHES J. (1983). Biogenesis, release and inactivation of enkephalins and dynorphins. Br. Med. Bull. 39:17-24
49. HUGHES J (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. Brain Research 88: 295-306.
50. HUGHES J, KOSTERLITZ H, MACKNIGHT T (1978). The incorporation of ³H-tyrosine into the enkephalins of striatal slices of guinea pig brain. Br. J. Pharmacol. Chemother. 63: 396 P.
51. HUGHES J, SMITH T, KOSTERLITZ H, FOTHERGILL L, MORGAN B and MORRIS H (1975). Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 255: 577-579.
52. IKEDA Y, NAKAO K, YOSHIMASA T, YANIHARA N, NUMA S and IMURA H (1982). Existence of Met-enkephalin-Arg⁶- Gly⁷-Leu⁸ with Met-enkephalin, Leu-enkephalin and Met-enkephalin Arg⁶- Phe⁷ in the brain of guinea pig rat and golden hamster. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107: 656-662.
53. IVERSEN L, IVERSEN S, BLOOM F, VARGO T and GUILLEMIN R (1978). Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. Nature London. 271: 679-681.
54. JACOB J (1982). Endogenous morphines and pain control. Panminerva Medica-Europa Medica. 24 (2): 155-159.
55. JACKSON R and BLOBEL G (1977). Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. Proc Natl Acad Sci Usa. 74: 5598-5602.
56. JAROS P, DIRCKSEN H and KELLER R (1985). Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab. Carcinus maenas c, (crustacea decapoda). Cell Tissue Res. 241: 111-117.

57. JONES B, SHIVELY J, KILPATRICK D, STERN A, LEWIS R, KOJIMA K and UDEFRIEND S (1982). Adrenal opioid proteins of 8,600 and 12,600 daltons: intermediates in proenkephalin processing, Proc Natl Acad Sci USA. 79: 2096-2100.
58. KAKIDANI H, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, NODA M, MORIMOTO M, HIROSE Y, ASAI M, INAYAMA S, NAKANISHI H and NUMA S (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo endorphin/dynorphin precursor. Nature 298: 245-249.
59. KANDEL R and SCHWARTZ H (1982). Principles of Neural Science. Elsevier/North-Holland. New York. Cap. 10. pag: 106-120.
60. KANGAWA K, MINAMINO N, CHINO N, SAKAKIBARA S and MATSUO H. (1981). The complete amino acid sequence of alpha-neo-endorphin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 99:871-878.
61. KAWAUCHI H, TSUBOKAWA M, ATSUSHI K and KITGAWA H (1980). Occurrence of two different endorphins in the Salmon pituitary. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92: 1278-1288.
62. KEMMLER W, STEINER F and BORG J (1973). Studies on the conversion of Proinsulin to Insulin. Studies in vitro with a crude secretion granule fraction isolated from rat islets of Langerhans. J. Biol. Chem. 248: 4544-4551.
63. KHACHATURIAN H, LEWIS E, SCHAFER K-H and WATSON S. (1985). Anatomy of the CNS opioid systems. TINS. March. 111-118.
64. Kilpatrick D, Eisen M, Ezza E and Udenfriend S (1983). Processing of prodynorphin at single and paired basic residues in porcine neurointermediate lobe. Life Sci. (Suppl 1) 33: 93.
65. KILPATRICK D, HOWELLS R, LAHM H-M and Udenfriend S. (1983). Evidence for a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. Proc Natl Acad Sci USA. 80: 5772-5775.

66. KILPATRICK D, JONES B, LEWIS R, STERN A, KOJIMA J, SHIVELY E and UDENFRIEND S (1982). An 18,200 dalton adrenal protein that contains four. Met-enkephalin sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 79: 3057-3061.
67. KILPATRICK D, JONES B, KOJIMA K, UDENFRIEND S (1981). Identification of the octapeptide Met-enkephalin-Arg⁶- Gly⁷- Leu⁸ in extracts of bovine adrenal medulla. Biochem. Biophys. Res. Comm. 103: 698-705.
68. KILPATRICK D, WAHLSTROM A, LAHM H-M, BLACHER R and UDENFRIEND S (1982). Rimorphin, a unique, naturally occurring (Leu)enkephalin-containing peptide found in association with norphin and alpha-neo-dinorphin. Proc Natl Acad Sci USA. 79: 6480-6483.
69. KOJIMA K, KILPATRICK D, STERN A, JONES B and UDENFRIEND S (1982). Proenkephalin: A general pathway for enkephalin biosynthesis in animal tissues. Arch. Biochem Biophys. 215: 638-643.
70. KOSTERLITZ H (1979). Possible physiological significance of multiple endogenous opioid agonists. In. Mechanisms of pain and analgesic compound. pp: 207-214. Ber, R.F. and Basset E. G. (eds). Raven Press N.Y.
71. KOSTERLITZ H and WATERFIELD A (1975). In vitro models in study of structure- activity relationships of narcotic analgesics. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 15: 29-47.
72. KREIBICH G, GZAKO - GRAKAM M, GREBENAW C and SABATINI D (1980). Functional and structural characteristics of endoplasmic reticulum protein associated with ribosome binding sites. Ann N.Y. Acad. Sci 17-37.
73. KREIL G (1981). Transfer of proteins across membranes. Ann. Rev. Biochem. 50: 317-348.
74. KREIGER D (1983). Brain peptides: What and Why? Science 222: 975-985.

75. KUHAR M and UHL G (1979). Histochemical localization of opiate receptors and the enkephalins. In: Neurochemical mechanism of opiate and endorphins. pp: 56-58. Loh H and Ross D (Eds). Raven Press. N.Y.
76. LEAKE D, CROW R and BURNSTOK G (1986). Localization of substance P-, Somatostatin-, Vasoactive intestinal polipeptide and Met- enkephalin-immunoreactive nerves in the peripheral and central nervous systems of the leech (Hirudo medicinalis). Cell. Tissue. 243: 345-351.
77. LEBOULENGER F, CUPO A, CATANAS E, BENYAMINA M, PELLETIER G and VAUDRY H (1986). Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of the pentapeptide Met-Enkephalin and the Heptapeptide Met-Enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ but not the octapeptide Met-Enkephalin-Arg⁶-Gli⁷-Leu⁸ in amphibian chromaffin cell. Neurochem Int. 8:303-309 (3).
78. LEBOULENGER F, CHARNAY Y, DUBOIS P, ROSSIER J and VAUDRY H (1984). Presence of proenkephalin in chromaffin cells of the frog adrenal gland. Neurochem Int. 6: 773-777. (6).
79. LEHNIGER L (1980). Bioquímica. Segunda Edición. Ediciones Omega. Barcelona España 1117 pag.
80. LEROITH D, LIOTTA A, ROCH J, SHILOACH J, LEWIS M, PERT C and KREIGER D (1982). Corticotropin and beta-endorphin-like materials are native to unicellular organisms. Proc Natl Acad Sc USA. 79: 2086-2090.
81. LEUNG M and STEFANO G (1983). Isolation of molluscan opioid peptides. Life Sci. 33 (suppl 1): 77-80.
82. LEWIS R, STERN A, KIMURA S, ROSSIER J, STEIN S and UDENFRIEND S (1980). A 50,000 dalton protein in adrenal medulla that may be a common precursor of Met- and Leu-enkephalin. Science 208: 1459-1461.
83. LEWIS R, STEIN S, GERBER L, RUBINSTEIN M and UDENFRIEND S (1978). High molecular weight opioid-containing protein in striatum. Proc Natl Acad Sci USA. 75: 4021-4023.

84. LI C and CHUNG D (1976). Isolation and structure of an untriakantapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. Proc Natl Acad Sci USA. 73: 1145-1148.
85. LIBERTUN C (). Principios de radioinmunoanálisis. Cap. 1. pp: 1-24.
86. LINDBERG I and Dhal J (1981). Characterization of enkephalin release from rat striatum. J. Neurochem. 36: 506-512.
87. LINDBERG I and WHITE L (1986). Reptilian Enkephalin: Implications for the evolution of proenkephalin. Arch. Biochem. Biophys. 245(1): 1-7.
88. LISTON D, PATEY G, ROSSIER J, VERBANCK P and VANDERHAEGHEN J (1984). Processing of proenkephalin is tissue specific. Science 225: 734-737.
89. LISTON D, VANDERHANEGEN J and ROSSIER J (1983). Presence in brain of synenkephalin, a proenkephalin-immunoreactive protein which does not contain enkephalin. Nature London 302: 62-65.
90. LOH Y and CHANG T (1982). Pro-opiocortin converting activity in rat intermediate and neural lobe secretory granules. FEBS Lett. 137: 57-62.
91. MAINS R, EIPPER B, GLEMBOTSKI C and DORES R (1983). Strategies for the biosynthesis of bioactive peptides. TINS June: 229-235.
92. MAINS R, EIPPER B and LING N (1977). Common precursor to coticotropins and endorphin. Proc Natl Acad Sci Usa. 74: 3014-3018.
93. MARTENS C, GIVELLI O and HERBERTT E (1985). Nucleotide sequence of cloned cDNA for Proopiomelanocortin in the Amphibian Xenopus laevis J.Biol. Chem. 260: 13685-13689.

94. MARTENS G and HERBERTT E. (1984). Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in Xenopus leavis. Nature 210: 251-254.
95. MARTIN W, EADES C, THOMPSON J, HUPPER R and Gilbert P (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in independent and morphine dependent chronic spinal dog. J. Pharm. Exp. Ther. 197: 517-532.
96. MAYER D and LIEBESKIN J. (1974). Pain reduction by local electrical stimulation of the brain. An anatomical and behavioural analysis. Brain Res. 68: 73-93.
97. MCKNIGHT A, HUGHES J and KOSTERLITZ H (1979). Synthesis of enkephalins by guinea pig striatum in vitro. Proc Res. Soci. London 205: 199-207.
98. MEYER D (1982). The signal hypothesis- a working model. trends Biochem Sci. 7: 320-321.
99. MILLER R (1981). Peptides as neurotransmitters: Focus on the enkephalins and endorphins. Pharmac. Ther. 12: 73-108.
100. MINAMINO M, KANGAWA K, CHINO N, SAKAKIBARA and MATSUO (1981). Beta-neo-endorphin, a new hypothalamic "big" Leu-enkephalin of porcine origin: its purification and the complete amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Comm. 99: 864-870.
101. MINAMINO N, KANGAWA K, FUKUDA A, MATSUO H and IAGARAKI M (1980). A new opioid octapeptide related to dynorphin from porcine hypothalamus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 95: 1475-1481.
102. MIZUNO K, MINAMINO N, KANGAWA K and MATSUO H (1980). A new family of "big" Met-enkephalins from bovine adrenal medulla: purification and structure of docosa (BAM-22P) and eicosapeptide) (BAM-20P) with very potent opiate activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 97:1283-1290).

103. MUDGE A, LEEMAN S and FISCH BACH G (1979). Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. Proc Natl Acad Sci USA. 76: 526-530.
104. NAKANISHI S, INQUE A, KITA J, NAKAMURA M, CHANG A, COHEN S and NUMA S (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. Nature. London 278: 423-427.
105. NAKAO K, SUD M, SAKAMOTO M, YOSHIMASA T, MORII N, IKEDA Y, YANAIHARA N, NUMA S and IMURA H (1983). Leumorphin is a novel endogenous opioid peptide derived from preproenkephalin B. Biochem. Biophys. Res. Comm. 117:695.
106. NEALE J, MCKELVY J and BARKER J (1980). The ribosomal synthesis and release of methionine-enkephalin and substance p by spinal cord and brain cultures. Neuropeptides 1:83-95.
- 106'. NEWMAN H (1948). The phylum chordata biology of vertebrates and their kin. New York the Macmillan Company.
107. NODA M, FUTURANI Y, TAKAHASHI H, TOYOSATO M, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S and NUMA S (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal proenkephalin. Nature 295:202-206.
108. OSBORNE H, HOLLT V and HERZ A (1978). Potassium induced release of enkephalins from rat striatal slices. Eur. J. Pharmacol. 48:219-221.
109. PALADE G (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 189: 347-358.
110. PASTERSON S, ROBSON L and KOSTERLITZ H (1983). Classification of opioid receptors. Br. Med Bull. 39:31.
111. PASTERNAK G, GINIZLER A, HOUHTEN R (1983). Biochemical and pharmacological evidence for opioid receptor multiplicity in the central nervous system. Life Sci. 33: suppl. 1:167-173.

112. PERT C, APOSHIAN D and SNYDER S (1974). Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.* 75: 356-561.
113. PERT C and SNYDER S (1973). Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014.
114. PESTARINO M. (1975). Occurrence of beta-endorphin-like immunoreactive cells in the neural complex of a protochordate. *Cell and Molecular biol.* 31 (1): 27-31.
115. PITTIUS W, KLEY N, LOEFFLER J and HOLLT V (1985). Quantitation of proenkephalin A messenger RNA in bovine brain, pituitary and adrenal medulla: Correlation between mRNA and peptides levels. *The EMBO J.* 4(5): 1257-1260.
116. PITTIUS W, SEIZINGER B, PASI A, MEHRAEIN P and HERZ A (1984). Distribution and characterization of opioid peptides derived from proenkephalin A in human and rat central nervous system. *Brain Res.* 304: 127-136.
117. PLOTNIKOFF P, MURY J, MILLER C, CORDER N and Faith E (1985). Enkephalins: Immunomodulators. *Fed. Procc.* 44(1): 118-122.
118. REMY C (1982). Parentés immunochimiques entre produits de neurosécrétion d'invertébrés et neuropeptides de vertébrés. *J. Physiol. Paris.* 78: 514-522.
119. REINIER A, DAVIS B, BRECHA N and KARTEN H (1984). The distribution of enkephalinlike immunoreactivity in the telencephalon of the adult and developing domestic chicken. *J. Comp. Neurol.* 228: 245-262.
120. ROBERTS J and HERBERT E (1977). Characterization of common precursor to corticotropin and beta-lipotropin. Cell free identification of corticotropin peptides in the molecule. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 74: 4826-4830.

121. ROBERTS, J. and PRITCHETT (1984). Does the kallikrein-like enzyme gene family code for a group of peptide hormone processing enzymes? *Trends Neurosci.* 7: 105-107.
122. ROMER S y PARSSONS S (1982). *Anatomia Comparada*. Quinta Ed. Nueva Editorial Interamericana. Cap. 16. pp: 329-361.
123. ROY B, JAMAL I and GO J (1982). Synaptic Mechanism of methionine enkephalin uptake. *Life Sci.* 31: 2307-2310.
124. RUEGG U, CUENOD S, HILLER J, CIOANNINI T, HOWELLS R and SIMON J (1981). Characterization and partial purification of solubilized active opiate receptor from toad brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78: 4635-4638.
125. RZASA P, KALOUSTION K and PROKOP E (1984). Immunochemical evidence for Met-enkephalin-like and Leu-enkephalin-like peptides in tissue of Earthworm. *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem Physiol.* 77: 345-350.
126. SABOL S, LIANG C, DANDEKAR S and KRANZLER L (1983). In vitro biosynthesis and processing of immunologically identified methionine-enkephalin precursor protein. *J Biol. Chem.* 258: 2697-2704.
127. SHICK R and SCHUSDZIARRA V (1985). Physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of exogenous and endogenous opiates. *Clin Physiol. Biochem.* 3: 46-60.
128. SCHULTZBERG M, LUNDBERG J, HOHFELT T, TERENIUS L, BRANDT J, ELDE R and GOLDSTEIN M (1978). Enkephalin-like immunoreactivity in gland cells and nerve terminals of the adrenal medulla. *Neurosci.* 3: 1169-1186.
129. SCHWARTS J, MALFROY B and DE LA BAUME S (1981). biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxipeptidase ("Enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.* 29: 1715-1740.

130. SEIZINGER B, HOLLT V and HERZ A (1981). Evidence for an opiate inactive N-acetylated derivative of leucine-enkephalin in the rat neurointermediate pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 101: 289-297.
131. SEIZINGER B, LEIBISCH D, GRAMSCH C HERZ A, WEBWE E (1985). Isolation and structure of a novel c-terminally amidated opiate peptide, amidrophin, from bovine adrenal medulla. *Nature* 313: 57-59.
132. SEIZINGER B, HOLLT V and HERZ A (1984). Proenkephalin B (Prodynorphin) derived opioid peptides: Evidence for a differential processing in lobes of the pituitary. *Endocrinology* 115: 662-671.
133. SIMANTOV R, GOODMAN R, APOSHIAN D and SNYDER S (1976). Phylogenetic distribution of a morphine-like peptide 'enkaphalin'. *Brain Res.* 111: 204-211.
134. SIMON J, BENYTHE S, BORSODI A, SZUCS M and WOLLEMAN M (1985). Separation of K-opioid receptor subtype from frog brain. *FEBS* 2481: 183 (2): 395-397.
135. SIMON E, HILLER J and EDELMAN (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesis ³H etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 70: 1947-1949.
136. SIMON J, SZUCZ M, BENYTHE S, BORSODIA A, ZEMAN P and WOLLEMAN M (1984). Solubization and characterization of opioid binding sites from frog (Rana esculenta) brain. *J. Neurochem.* 43:957-963.
137. SMITH T, HUGHES J, KOSTERLITZ H and SOSA R (1976). Enkephalins isolation, distribution and function. In H.W. Kosterlitz (Ed.). *Opiate and Endogenous Opioid peptides.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp: 57-62.
138. SMITH M and SMITH B (1971). Analysis of the literature on the Mexican Axolotl. SYNOPSIS OF THE HERPETOFAUNA OF MEXICO. Vol 1. Eric Lundberg. Augusta West Virginia.

139. SMYTH D, MASSEY D, ZAKARIAN S and FINNIE M (1979). Endorphins are stored in biologically active and inactive forms, isolation of alpha-A-acetyl peptides. *Nature* 279: 252-254.
140. SNYDER S (1981). Los receptores de los opiáceos y sustancias opiáceas endógenas. "El Cerebro". *Investigación y Ciencia*. pp: 154-168.
141. STEINER, DOCHERTY K and CAROL R (1984). "Golgi/granule processing of peptide hormone and neuropeptide precursors: Minireview". *J. Cell. Biochem.* 24: 121-130.
142. STEINER, QUINN S, CHAN J, MARSH J and TAGER (1980). Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. *Annls N.Y. Acad. Sci.* 1-16.
143. STERN A, LEWIS R, KIMURA S, ROSSIER J, GERBER L (1979). Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin-Arg⁶-phe⁷ from bovine adrenal medullary granules and striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6680-6683.
144. STERN A, LEWIS R, KIMURA S, ROSSIER J, STEIN S and UDENFRIEND S (1980). Opioid hexapeptides and heptapeptides in adrenal medulla and brain, possible implications on the biosynthesis of enkephalin. *Arch. Biochem. Biophys.* 205: 606-613.
145. TACHIBANA S, ARAKI K, OHYA S and YOSHIDA S (1982). Isolation and structure of dynorphin, an opioid peptide, from porcine duodenum. *Nature* 295: 339-341.
146. TAKAHASHI A, KAWAUCHI H, MOURI T and SASAKI A (1984). Chemical and Immunological characterization of salmon endorphins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53: 381-388.
147. TAKEDA M, TAKEDA F, MATSUMOTO F, TUNA R and KANO K (1982). Divalent cation, ATP-dependente ³H-Leu-Enkephalin Uptake by synaptic vesicle forebrain isolated from bovine caudate nucleus. *Brain Res.* 234: 319-326.

148. TANG F, COSTA E and SCHWARTZ J (1983). Increase of proenkaphalin mRNA and enkaphalin content of rat struatum aftedaily injections of haloperidol for 2 to 3 weeks. Proc Natl Acad Sci. USA 80: 3841-3844.
149. UDEFRIEND S and KILPATRICK D (1983). Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. Arch. Biochem. Biophys. 221: 309-323.
150. VAUDRY H, JENKS B and OBERBEEKE V (1984). Biosynthesis processing and release of pro-opiomelanocortin related peptides in the intermediate lobe of the pituitary gland of the frog- (Rana ridibunda). Peptides 5: 905-912.
151. VINDROLA O, ASAI M, ZUBIETA M and LIPARES G (1983). Brain content of immunoreactive Leu⁵ Enkephalin and Met⁵ Enkephalin after pentilenetetrazole-induced convulsions. Eur. J. Pharmacol. 90:85-89.
152. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M and FERNANDEZ-GUARDIOLA A (1981). Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. Neuroscience letters. 21: 39-43.
153. WATSON S, AKIL H, RICHARD C and BARCHAS J (1978). Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. Nature 275: 226-228.
154. WATSON S, KHACHATURIAN H, AKIL H, COY D and GOLDSTEIN A (1982). Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. Science 218: 1134-1136.
155. WATT C, LI W, FRY K and LAM D (1985). Localization of enkephalin-like immunoreactive amacrine cells in the larval Tiger salamander retina: A light and electron microscopic study. J. Comp. Neurol. 24: 1179-1179.
156. WEBER E, ESCH F, BOHLEN P, PATERSON S, COBERT A, MCKNIGHT A, KOSTERLITZ H, BARCHAS J and EVANS C (1983). Metorphamide: isolation, structure and biologic activity of an amidated opioid octapeptide from bovine brain. Proc Natl Acad Sci USA. 80: 7362-7366.

157. WEHE E, MCKNIGHT A, CORBERTT A and KOSTERLITZ H (1985). Proenkephalin- and Prodynorphin- derived opioid peptides in guinea pig heart. Neuropeptides 5: 453-456.
158. WEICHERT C y PRESCH W (1981). Elementos de anatomia de los Cordados. 4a. edición. Mc. Graw. hill; 531 pags.
159. WHITE J, STEWART K, KRAUSE J and MCKELVY J (1985). Biochemistry of peptide-secreting Neurons. Am. Physiol. Soc (65) 3: 553-606.
160. WILLIAMS R and DOKRAY (1983). Distribution of enkephalin related peptides in rat brain: immunohistochemical studies using antisera to Met-enkephalin and Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ Neurosci. 9: 563-586.
161. ZAKARIAN S and SMYTH D (1982). Beta-endorphin is processed differently in specific regions of rat pituitary and brain. Nature 296: 250-252.
162. ZAMIR N, PALKOVITS M, WEBER E, MESEY E and BROWNSTEIN M (1984). A dynorphinergic pathway of leu-enkephalin production in rat substantia nigra. Nature 307: 643-645.
163. ZAMIR N, ZAMIR D, EIDEN L, PALKOVITS M, BROWNSTEIN M, (1985). Methionine and Leucine enkephalin in rat neurohipophysis: Different responses to osmotic stimuli and T₂ toxin. Science 228: 606-608.
164. ZIPSER B (1980). Identification of specific leech neurones immunoreactive to enkephalin. Nature 283: 857-858.

APENDICE

- Agonista:** Substancia que se une a los sitios receptores y produce una respuesta biológica (149).
- Alcaloide:** A partir de la descripción sobre la capacidad de la morfina para formar sales, a las substancias que presentan esta característica se les conoce como alcaloides (28).
- Antagonista:** Substancia que a pesar de unirse a los sitios receptores no es capaz de producir ninguna respuesta biológica o bien revierten o previenen la unión del material activo (149).
- Opiáceo:** El término opiáceo, en un sentido farmacológico se utiliza para referirse a las drogas alcaloides que inducen analgesia in vitro y cuyos efectos son prevenidos o revertidos por antagonistas de la morfina (naloxona, naltrexona) (149).
- Opioide:** Con el descubrimiento de las encefalinas se introdujo el término opioide, para referirse a los péptidos endógenos que son los agonistas naturales de los receptores opiáceos; opioide también se usa para referirse a los péptidos sintéticos que son análogos a los naturales (149).